

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**FENILCETONÚRIA E LEUCINOSE:  
CO-FACTORES E ANTI-OXIDANTES – NOVOS  
BIOMARCADORES?**

**Joana Andreia da Silva Gonçalves Palma Mira**

**Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar**

**2015**



A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 28 de Abril de 2015.

O autor desta Dissertação não adoptou o novo acordo ortográfico.





**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**FENILCETONÚRIA E LEUCINOSE: CO-FACTORES E ANTI-  
OXIDANTES – NOVOS BIOMARCADORES?**

Todas as informações efectuadas ao presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nela apresentados.

**Joana Andreia da Silva Gonçalves Palma Mira**

**Orientador:** Professor Doutor Manuel Diamantino Pires Bicho, FMULisboa

**Co-Orientador:** Professora Doutora Maria Isabel Ginestal Tavares de Almeida, FFULisboa

**Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar**

**2015**



Para os meus pais.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b><u>CAPÍTULO I.....</u></b>	<b>17</b>
1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	19
<b><u>CAPÍTULO II.....</u></b>	<b>21</b>
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Conceitos gerais.....	23
2. AMINOACIDOPATIAS .....	27
2.1 Fenilcetonúria .....	27
2.1.1 Fisiopatologia .....	28
2.1.3 Genética .....	33
2.2 MSUD.....	35
2.2.1 Fisiopatologia .....	36
2.2.2 Genética .....	42
2.3. Testes de Diagnóstico para a PKU e MSUD .....	43
2.4 Tratamento .....	45
2.4.1 PKU .....	45
2.4.2 MSUD.....	51
2.5 Stresse oxidante.....	57
<b><u>CAPÍTULO III.....</u></b>	<b>61</b>
1. OBJECTIVOS .....	63
<b><u>CAPÍTULO IV.....</u></b>	<b>65</b>
1. MATERIAL E MÉTODOS .....	67
1.1 Amostra estudada.....	67
1.2. Métodos .....	68
<b><u>CAPÍTULO V.....</u></b>	<b>75</b>
1. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
<b><u>CAPÍTULO VI.....</u></b>	<b>93</b>
1. COMENTÁRIOS FINAIS.....	95
2. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	98
<b><u>AGRADECIMENTOS.....</u></b>	<b>101</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA .....</u></b>	<b>105</b>
<b><u>ANEXOS .....</u></b>	<b>113</b>



## ABREVIATURAS

<b>BCAAs</b>	(Branched chain amino acids) Aminoácidos de cadeia ramificada
<b>BCKs</b>	(Branched chain ketoacids) Cetoácidos de cadeia ramificada
<b>BCKD</b>	(Branched chain ketoacid dehydrogenase) Desidrogenase dos cetoácidos de cadeia ramificada
<b>BCKAs</b>	(Branched chain ketoacids) Cetoácidos de cadeia ramificada
<b>BH4</b>	(Tetrahydrobiopterin) Tetra-hidrobiopterina
<b>Cys</b>	(Cysteine) Cisteína
<b>Cys-Gly</b>	(Cysteinilglycine) Cisteinilglicina
<b>DPHR</b>	(Dihydrobiopterin reductase) Di-hidrobiopterina redutase
<b>EHM</b>	(Inborn errors of metabolism) Erros Hereditários do Metabolismo
<b>FAD</b>	(Flavine adenine dinucleotid) Flavina adenina dinucleótido
<b>FID</b>	(Flame ionization detector) Detector de ionização de chama
<b>GC</b>	(Gas chromatography) Cromatografia gasosa
<b>GSH</b>	(Gluthathione) Glutatio
<b>GTP</b>	(Guanosine triphosphate) Guanosina-trifosfato
<b>GTPCH</b>	(Guanosine triphosphate cyclohydrolase) Guanosina trifosfato ciclo-hidrolase
<b>HPA</b>	(Hyperphenylalaninemia) Hiperfenilalaninémia
<b>I(Cys)<sub>2</sub></b>	(Free Cystine) Cistina livre
<b>LNAA</b>	(Neutral amino acids) Aminoácidos neutros
<b>Met</b>	(Methionine) Metionina
<b>MMA</b>	(Methylmalonic acid) Ácido metilmalónico
<b>MPG</b>	(2 – Mercaptoprionylglycine) 2- Mercaptoprionilglicina
<b>MSUD</b>	(Leucinos / Maple Syrup Urine Disease) Leucinose

<b>MTBSTFA</b>	(N-methyl-N-(ter-butildimethyl(silil)trifluoroacetamide) N-metil-N-(ter-butildimetil(silil)trifluoroacetamida)
<b>MUT</b>	(Methylmalonic acid mutase) Ácido metilmalónico mutase
<b>NADPH</b>	(Nicotinamideadenine dinucleotide phosphate) Nicotinamida - adenina - dinucleótido fosfato reduzido
<b>PAH</b>	(Phenylalanine hidroxilase) Fenilalanina hidroxilase
<b>PCD</b>	(Pterin-4 <sup>a</sup> -carbinolamine dehydratase) Pterina-4 <sup>a</sup> -carbinolamina desidratase
<b>Phe</b>	(Phenylalanine) Fenilalanina
<b>PKU</b>	(Phenylketonuria) Fenilcetonúria
<b>PT</b>	(Phenylalanine (histidine) transaminase) Fenilalanina (histidina) transaminase
<b>PTPS</b>	(Pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase) Piruvil-tetra-hidrobiopterina
<b>RN</b>	(New born) Recém – nascido
<b>RNS</b>	(Nitrogen reactive species) Espécies reativas de azoto
<b>ROS</b>	(Oxygen reactive species) Espécies reativas de oxigénio
<b>RS</b>	(Reactive species) Espécies reativas
<b>SD</b>	(Standart deviation) Desvio padrão
<b>SR</b>	(Sepiapterin reductase) Sepiapterina reductase
<b>TH</b>	(Tyrosine hydroxylase) Tirosina hidrolase
<b>TPH</b>	(Tryptophane hidrolase) Triptofano hidrolase
<b>TPP</b>	(Tiamine pyrophosphatase) Tiamina Pirofosfato
<b>Trp</b>	(Tryptophane) Triptofano
<b>Tyr</b>	(Tyrosine) Tirosina
<b><math>\alpha</math>KIC</b>	( $\alpha$ -ketoisocaproic acid) Ácido $\alpha$ -cetoisocapróico



## RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) e a leucínose (MSUD-maple syrup urine disease-) são erros hereditários do metabolismo respectivamente associados à deficiência em fenilalanina hidroxilase (PAH) ou ao complexo enzimático que promove a descarboxilação dos cetoácidos de cadeia ramificada. O tratamento baseia-se, essencialmente, numa dieta pobre em proteínas naturais, restrita nos aminoácidos que não são metabolizados e suplementada com uma mistura dos restantes aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. O incumprimento da dieta pode levar à deficiência em micronutrientes comprometendo diversos processos metabólicos celulares vitais, nomeadamente o sistema antioxidante.

O objectivo do trabalho desenvolvido foi o de investigar a correlação entre os níveis de tióis plasmáticos e seus determinantes, em doentes quer PKU quer MSUD sob tratamento dietético, através da avaliação da cisteína total (tCys), cisteinilglicina (Cys-Gly), glutatióno total (tGSH) e dos seus precursores – metionina (Met); glicina (Gly), cistina livre (l(Cys)<sub>2</sub>) e homocisteína total (tHcy) -, e ainda o ácido metilmalónico, reconhecido como um biomarcador precoce da deficiência em VitB<sub>12</sub>.

Foram utilizados os métodos analíticos (HPLC, GC e GC-MS) em uso no laboratório. Analisou-se um total de 183 amostras de plasma sendo 74 de doentes com PKU (n=21) e 109 de doentes MSUD (n=8) sob tratamento dietético. As amostras foram seleccionadas aleatoriamente entre as existentes no laboratório provenientes das colheitas enviadas para controlo dos marcadores patognomónicos das patologias referidas. A análise estatística foi efectuada usando o GraphPad Prism software V6.00. As correlações foram analisadas usando o coeficiente de correlação de Pearson. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

A análise dos resultados mostrou, apenas para a tCys ( $p<0,0249$ ) e Cys-Gly ( $p<0,0024$ ) uma diferença com significância entre as duas populações de amostras (PKU versus MSUD) avaliadas. Os valores médios dos restantes biomarcadores assim como a distribuição em relação à média revelaram grande semelhança entre si. É ainda de salientar que a percentagem, em cada grupo, para o mesmo biomarcador com valores inferiores ao valor mínimo de referência foi igualmente semelhante. Estes resultados permitem-nos especular que os parâmetros analisados não são dependentes da patologia per se mas sim modulados pelas terapias dietéticas instituídas em cada grupo, face à semelhança entre ambas quanto ao tipo de suplementação em vitaminas, minerais e nutrientes essenciais.

Os resultados mostraram que o teor de tGSH se encontrava abaixo do nível de referência mínimo numa percentagem elevada de amostras: 48,6% no grupo PKU e 67,9% no grupo MSUD, assim como os valores de Cys-Gly, I(Cys)<sub>2</sub> e de tHcy. Encontrou-se uma correlação fortemente significativa ( $p<0,001$ ) entre o tGSH e a Cys-Gly e entre esta e a tHcy, em ambos os grupos de amostras.

Em resumo, os dados encontrados mostram que a síntese do GSH pode estar afectada e que há uma correlação com os seus determinantes. Assim, os resultados obtidos mostram com alguma clareza a necessidade de se explorar estes dados num estudo alargado e desenhado tendo em consideração o emparelhamento entre idades, sexo e dieta e uniformidade no que respeita a colheita das amostras (tempo jejum, fase pré-analítica e armazenamento). Dados que poderão vir a permitir uma manipulação da dieta mais eficaz no tratamento das patologias referidas.

**Palavras – chave:** fenilcetonúria, leucinose, tratamento dietético, deficiências nutricionais; stresse oxidante

## SUMMARY

Phenylketonuria (PKU) and Maple Syrup Urine Disease (MSUD) are inborn errors of metabolism associated respectively with deficient phenylalanine hydroxylase activity, and deficiency of branched chain keto-acid decarboxylase complex. Treatment is based on a natural protein restricted diet, free of non metabolized amino acids and supplemented with amino acid mixtures enriched with trace elements, vitamins, and minerals. Poor compliance with the diet may lead to micronutrients' deficiencies compromising several vital cellular metabolic processes such as the antioxidant system.

The aim of the developed study was to investigate any correlations that may exist between the plasma thiol concentrations (homocysteine, cysteine and glutathione) and their determinants (methionine, cobalamin and folate) in PKU and MSUD patients under dietary treatment through the evaluation of total cysteine (tCys), cysteinylglycine (Cys-Gly), total glutathione (tGSH) and their precursors – methionine (Met); glycine (Gly), free cysteine (l(Cys)<sub>2</sub>) and total homocysteine (tHcy) - and also methylmalonic acid concentrations, reckoned as a vitB<sub>12</sub> deficiency early biomarker.

Analytical methods (HPLC, GC e GC-MS) present at the laboratory were used. A total of 183 plasma samples were analyzed, 74 of which belonged to PKU patients (n=21) and 109 belonged to MSD patients (n=8), both groups were under dietetic treatment. Samples were randomly selected among the pre-existing in the laboratory which had been previously collected and sent for pathognomonic marker control of the previously referred pathologies. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism software V6.00. The correlations were analyzed using Pearson's correlation coefficient ( $p < 0,05$  was considered statistically significant).

Analysis of the results showed, only for tCys ( $p<0,0249$ ) and Cys-Gly ( $p<0,0024$ ), a statistically significant difference between the two sets of samples (PKU versus MSUD) studied. The average values and the mean distribution for the other biomarkers have shown great similarities among themselves. It should also be noted that the percentage in each group for the same biomarker, with results inferior to the lower reference value, were similar. These results allow us to speculate that the analyzed parameters aren't disease dependent per se but modulated by the dietetic therapies implemented in each group, due to the similarity between both concerning micronutrient supplementation.

Results show that the concentration of GSH was lower than the reference value in a high percentage of samples: 48,6% in the PKU group and 67,9% in the MSUD group. Cys-Gly, l(Cys)<sub>2</sub> and tHcy concentrations were also low. A strong statistically significant ( $p<0,001$ ) correlation was found between tGSH and Cys-Gly and between the later and tHcy, in both group samples.

In conclusion, the data found show that GSH synthesis may be affected and that this is correlated to its determinants. Thus, the given results clearly show a need to explore these data in an extended study considering age, gender and diet matching and uniformity collecting samples (fasting period, pre-analytical stage and storage). These data may allow us to more effectively manipulate the dietetic treatment of the studied pathologies.

**Key – words:** phenylketonuria, maple syrup urine disease; dietetic treatment; nutritional deficiencies; oxidative stress

# **CAPÍTULO I**

## *Estrutura da Dissertação*



## **1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

A Introdução da dissertação é apresentada no capítulo II, onde são apresentados conceitos básicos assim como um apontamento breve que enquadra, no contexto das doenças raras, o grupo dos EHM.

De seguida, são abordadas com algum detalhe os EHM, com designação genérica de aminoacidopatias, a PKU e a MSUD, objecto de interesse do presente estudo. A segunda parte da introdução é dedicada ao tratamento dietético com algum ênfase nos procedimentos preconizados no controlo sistemático do tratamento instituído. A terceira parte da introdução incide no processo do stresse oxidante e no sistema antioxidante dado que o objectivo do presente trabalho foi o de avaliar o comportamento do glutathione e dos seus determinantes em situações de dieta com restrição de proteína natural.

No capítulo III são apresentados os objectivos gerais específicos da dissertação.

O capítulo IV é dedicado à exposição do estudo experimental que inclui: a população das amostras analisadas; a descrição dos metabolitos analisados e de uma forma breve, dado serem os que estão em uso no laboratório, os métodos analíticos usados na avaliação dos compostos seleccionados.

No capítulo V são apresentados os resultados obtidos e discutidas as suas putativas correlações face às interligações existentes entre as vias metabólicas da homocisteína e do glutathione. O capítulo VI é dedicado à mensagem que a análise global dos resultados é passível de transmitir e a breves notas referentes a perspectivas futuras.

Nos anexos, encontram-se as tabelas e gráficos dos parâmetros analisados quer agrupadas no seu todo quer individualizadas por grupo de amostras.





## **CAPÍTULO II**

### *Introdução*



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Conceitos gerais**

O estudo do metabolismo intermediário, dos processos metabólicos, da sua regulação e da actuação de todas as moléculas que lhe estão associadas, constitui uma área do conhecimento que em última instância permite o entendimento dos mecanismos de acção, da toxicidade e da interacção de substâncias que, entre outras aplicações, tem uma repercussão prática na medicina, no diagnóstico e no tratamento de todas as patologias originadas por problemas ou alterações do metabolismo intermediário. Como em todos os processos bioquímicos, existe sempre a possibilidade de existirem erros, que se podem manifestar de diferentes formas.

Os Erros Hereditários do Metabolismo (EHM) são um grupo vasto de patologias heterogéneas que possuem como denominador comum o facto de serem doenças monogénicas, em geral, de transmissão autossómica recessiva e, ocasionalmente, ligadas ao cromossoma X.

Os EHM quando considerados individualmente são doenças raras ou órfãs dado que afetam menos de 1 indivíduo em cada 2.000, tal como definido pela Comissão de Saúde Pública da UE<sup>[1]</sup>. Contudo, no seu todo estima-se que atingem 1 em cada 780 nados-vivos<sup>[2]</sup> deixando, assim, o grupo dos EHM de serem doenças raras e, deste modo, contribuindo com um número significativo de casos no foro da pediatria. Atribui-se a este grupo de patologias cerca de 5% dos internamentos nos serviços de pediatria.

Os EHM são um grupo heterogéneo e as diferentes fisiopatologias associadas estão habitualmente divididas em três grandes sub-grupos de doenças: intoxicação; metabolismo energético e moléculas complexas<sup>[3]</sup>.

## Doenças de intoxicação

Este grupo inclui EHM associados a intoxicações agudas ou progressivas, devido aos metabolitos intermediários tóxicos que se acumulam na proximidade do local do bloqueio metabólico<sup>[3]</sup>. Neste grupo estão incluídos os erros hereditários do catabolismo de aminoácidos (por ex., a PKU, a MSUD, a homocistinúria, a tirosinémia e a maioria das acidúrias orgânicas, tais como, as acidúrias metilmalônica, propiônica, isovalérica, etc.), os defeitos hereditários do ciclo da ureia, a intolerância aos açúcares (por ex., a galactosémia e a intolerância hereditária à frutose), as intoxicações por metais (por ex., as doenças de Wilson e de Menkes, e a hemocromatose) e as porfírias.

Todas as patologias incluídas neste grupo partilham semelhanças clínicas: não interferem com o desenvolvimento embrionário, apresentam-se com um intervalo livre de sintomas e manifestam-se com sinais clínicos de intoxicação que podem ser agudos, expressando-se sobre a forma de vômitos, coma, falência hepática, complicações tromboembólicas, entre outros; ou crônicos, expressando-se sobre a forma de má progressão ponderal, atrasos no desenvolvimento cognitivo e motor, cardiomiopatia, entre outros.

As circunstâncias que podem induzir a uma situação de crise, em geral, incluem: stresse; febre; infecções e alterações na dieta. O diagnóstico passa pela identificação dos biomarcadores patognomónicos através da análise dos perfis, plasmático e / ou urinário, de aminoácidos, de ácidos orgânicos e de acilcarnitinas.

A maioria destas patologias são passíveis de ser tratadas, ou controladas, através de dietas específicas com restrição proteica, suplementadas com elementos essenciais e misturas de aminoácidos e, ainda, coadjuvadas com fármacos que auxiliam na

remoção dos metabolitos tóxicos ou na modulação dos efeitos nefastos inerentes à patologia<sup>[4]</sup>.

### Doenças do metabolismo energético

São EHM do metabolismo intermediário que se caracterizam por apresentarem sintomatologia inerente a deficiente produção de energia ou de utilização da mesma, afetando diversos tecidos, nomeadamente o miocárdio e o músculo esquelético, e órgãos, sendo o fígado e o cérebro os mais atingidos<sup>[3]</sup>. Este grupo de patologias é, em geral, subdividido em dois grandes grupos: defeitos mitocondriais e defeitos citoplasmáticos.

Os defeitos mitocondriais são os mais graves e, geralmente, sem tratamento efetivo. Neste grupo estão englobadas patologias, tais como: as acidémias lácticas hereditárias (por ex., defeitos no transportador do piruvato, na piruvato carboxilase, no sistema da piruvato desidrogenase e no ciclo de Krebs); os defeitos da cadeia respiratória; os defeitos da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos e as alterações na síntese dos corpos cetónicos.

Os defeitos do metabolismo energético citoplasmático são, habitualmente, menos severos e referem-se, nomeadamente, a alterações no processo: da glicólise; do metabolismo do glicogénio; da gliconeogénese e da síntese de creatina.

O processo de diagnóstico deste grupo de patologias é complexo e a efetivação do mesmo pode requerer, para além da pesquisa e caracterização de mutações nos genes envolvidos, de um modo geral, e ainda a avaliação da função enzimática o que pode implicar a realização de uma biópsia hepática, muscular ou de pele<sup>[5]</sup>.

### Doenças das moléculas complexas

Este grupo de patologias envolve diversos organelos celulares e devem-se a alterações quer na via de síntese quer na de catabolismo de moléculas complexas. Os sintomas são permanentes, progressivos, independentes de eventos intercorrentes e da dieta. Todas as patologias de armazenamento lisossomal, as doenças do peroxissoma, as patologias com alterações de transporte intracelular e processamento, os erros hereditários de glicosilação e da síntese do colesterol pertencem a este grupo de doenças. Apesar da dificuldade de tratamento destas patologias, começam a estar disponíveis fármacos (essencialmente de reposição enzimática), dirigidos às patologias do lisossoma, que apresentam uma eficácia terapêutica, em alguns casos, relevante<sup>[5]</sup>.

## 2. AMINOACIDOPATIAS

### 2.1 Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) foi descrita pela primeira vez em 1934 por Asbjörn Fölling<sup>[67]</sup>. Trata-se de uma doença autossómica recessiva resultante da deficiente actividade da enzima fenilalanina hidroxilase (*phenylalanine hydroxylase* - **PAH**)<sup>[8]</sup>. Quando não tratada, é associada a um atraso mental grave, acompanhado de outros sintomas que incluem: eczema, autismo, convulsões e deficiência motora. Ao longo do crescimento podem ainda ocorrer problemas de desenvolvimento e sintomas do foro psiquiátrico<sup>[8-9]</sup>.

A prevalência da PKU varia no mundo. Na Europa a prevalência média é de cerca de 1:10.000 nados-vivos<sup>[10]</sup>. Portugal, apresenta uma prevalência média similar à Europeia, de 1:12.500 nados-vivos<sup>[11]</sup>. Todavia, em alguns países Europeus, a prevalência é mais alta, o que parece estar associada à elevada consanguinidade existente em algumas populações, como é o caso da população Turca<sup>[12]</sup> e a da Irlanda do Norte<sup>[13]</sup>. Entre os países Europeus, a Finlândia apresenta a prevalência mais baixa, de 1:100.000 nados-vivos<sup>[14]</sup>.

Nos EUA a prevalência da PKU é de cerca de 1:15.000 nados-vivos, sendo próxima da Europeia. Na América Latina varia entre 1:25.000 e 1:50.000 nados-vivos, sendo a prevalência, em geral, mais elevada nos países do Sul da América Latina do que noutras áreas desta região<sup>[15]</sup>.

Na Ásia, consoante as regiões, é estimado que a prevalência média varie entre 1:15.000 e 1:100.500 nados-vivos (nas regiões da China)<sup>[16-17]</sup>, sendo de

menos de 1:200.000 na Tailândia<sup>[18]</sup>. No Japão<sup>[19]</sup> é ainda mais rara, assim como, em África de acordo com os dados existentes<sup>[20]</sup>.

### 2.1.2 Fisiopatologia

A PKU é um erro hereditário do metabolismo, caracterizado por mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH)<sup>[20]</sup>. A PAH é a enzima que converte a fenilalanina (*phenylalanine* – **Phe**) em tirosina (*tyrosine* – **Tyr**) e necessita da presença da tetra-hidrobiopterina (*tetrahydrobiopterin* - **BH4**), como co-factor, oxigénio molecular e ferro.<sup>[21]</sup> A perda de actividade da PAH resulta em concentrações aumentadas de fenilalanina no sangue e na presença de níveis tóxicos no cérebro<sup>[8-9]</sup>.

Caracteriza-se por hiperfenilalaninémia (*hyperphenylalaninemia* - **HPA**) persistente, sempre que as concentrações plasmáticas de Phe excedem o limite do valor de referência [120 µM]<sup>[8]</sup>, e é classificada como HPA ligeira quando o valor de Phe é < a 600 µM<sup>[8]</sup> e de moderada para valores de Phe entre 600 e 1200 µM<sup>[8]</sup>. Na fenilcetonúria clássica ou simplesmente designada por PKU, a Phe plasmática, sem restrição proteica, atinge valores superiores a 1.200 µM, dez vezes o limite máximo do valor de referência.

Em cerca de 98% dos casos, a HPA deve-se a alterações na estrutura da enzima PAH (ver figura II.1), determinada por mutações presentes no gene da *PAH*. Os restantes 2% devem-se a défices na via de síntese da BH<sub>4</sub>, o co-factor da PAH, ou na via da regeneração da BH<sub>2</sub> a BH<sub>4</sub><sup>[22]</sup>.



A Phe é um dos aminoácidos essenciais<sup>[23]</sup> (ver quadro II.1), e como tal não é sintetizado pelo organismo, assim, a sua obtenção provém exclusivamente da alimentação. Como já referido, o produto da sua hidroxilação é o aminoácido Tyr<sup>[23]</sup>, cuja total metabolização leva à formação de fumarato e acetato, os quais são utilizados pelo ciclo de Krebs para posterior produção de energia pela cadeia respiratória ou re-encaminhados para a síntese da glicose *de novo* pela via da gliconeogénese (ver figura II.1)<sup>[24]</sup>.

**Quadro II.1.** Recomendações diárias de aminoácidos essenciais. Adaptado de WHO, 1985.<sup>[23]</sup>

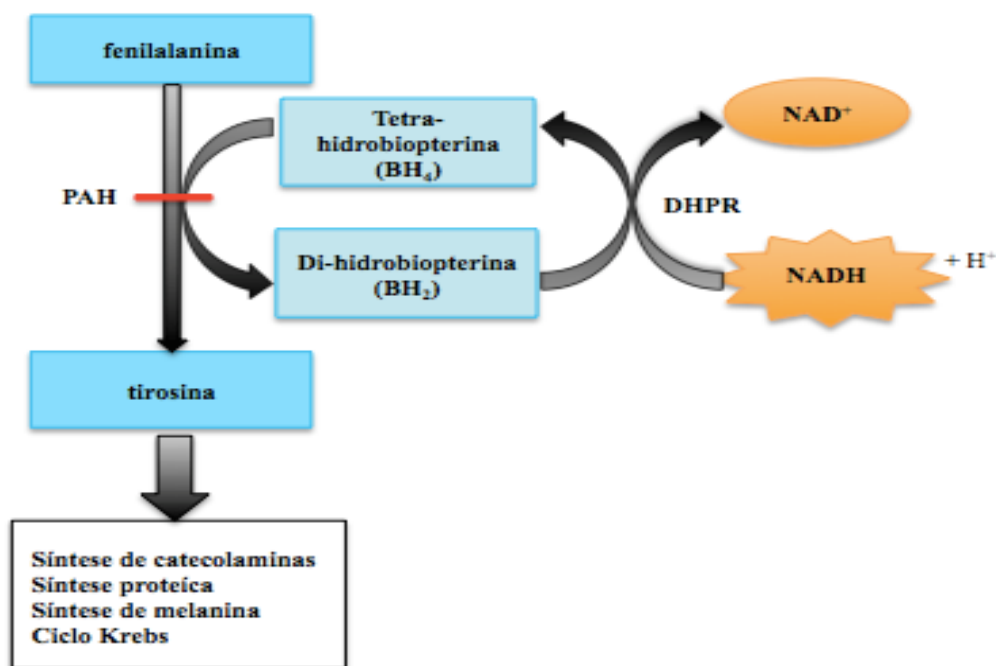
Aminoácido	3-4meses (mg/kg/dia)	> 2 anos (mg/kg/dia)	10-12 anos (mg/kg/dia)	Adultos (mg/kg/dia)
Histidina <sup>a</sup>	28	Ind. <sup>b</sup>	Ind. <sup>b</sup>	10-12
Isoleucina	70	31	28	10
Leucina	161	73	44	14
Lisina	103	64	44	12
Metionina e cistina	58	27	22	13
Fenilalanina e tirosina	125	69	22	14
Treonina	87	37	28	7
Triptofano	17	12,5	3,3	3,5
Valina	93	38	25	10

<sup>a</sup>essencial apenas nas crianças; <sup>b</sup>indeterminado

Os aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr e triptofano (*tryptophane* -**Trp**)) partilham o mesmo sistema de transporte na barreira hematoencefálica<sup>[25]</sup> e, deste modo, competem entre eles. Consequentemente, a presença de níveis circulantes elevados de Phe leva a uma diminuição da biodisponibilidade cerebral de Trp e de Tyr<sup>[26]</sup>. Esta diminuição causa depleção de serotonina e de catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina), influenciando assim a função cerebral, uma vez que aqueles metabolitos atuam como neurotransmissores. Deste modo, mecanismos como o da excitabilidade neuronal, da condução axonal e da velocidade de transmissão sináptica encontram-se, geralmente, afetados nos

indivíduos com PKU<sup>[26]</sup>.

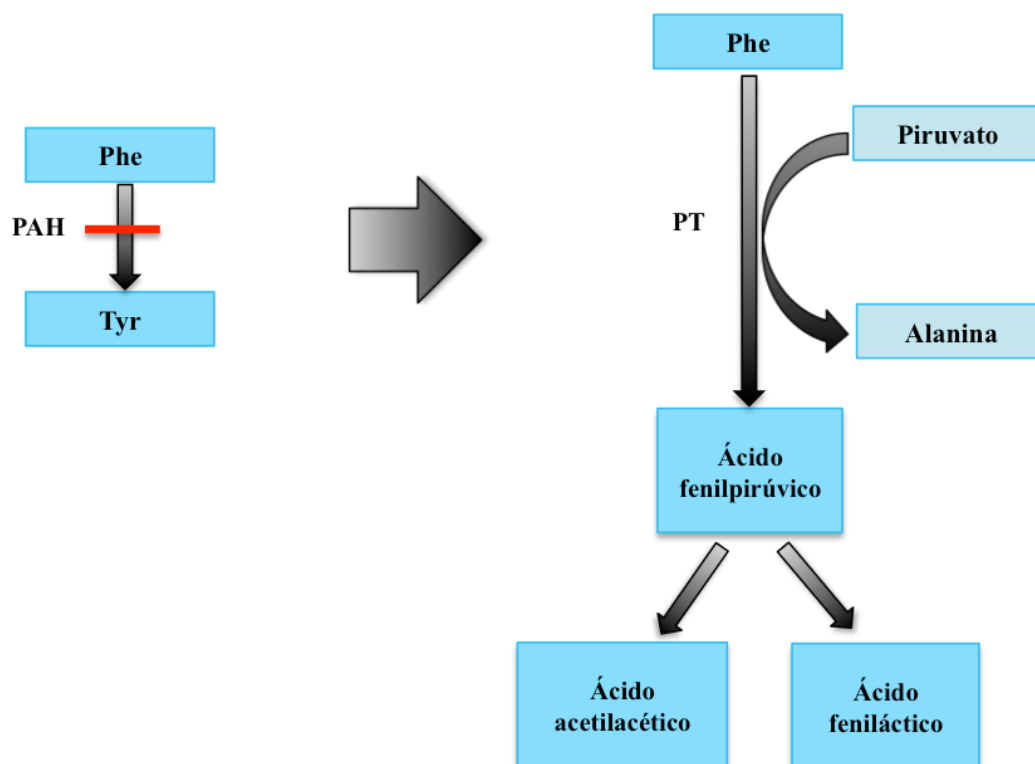
Quando a hidroxilação da Phe não ocorre ou está reduzida, as vias metabólicas secundárias são ativadas (ver figura II.2) e formam-se compostos derivados da Phe, tais como: o fenilpiruvato, o fenilacetato, o fenilactato e a fenilacetilglutamina<sup>[21]</sup>.



**Figura II.1.** Via metabólica da hidroxilação da fenilalanina. A enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) converte o aminoácido Phe em Tyr na presença do co-factor tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), oxigénio e ferro. Nos indivíduos PKU, a enzima PAH apresenta uma actividade diminuída ou nula por perda de função ou por deficiente concentração do co-factor, BH<sub>4</sub>, não ocorrendo assim a hidroxilação da Phe em Tyr e levando à acumulação do primeiro.

Estes metabolitos são biomarcadores não específicos, dado que a sua formação pode ser produto da metabolização da Phe pela ação de bactérias intestinais. Contudo, estes metabolitos foram utilizados durante largos anos, nomeadamente o fenilpiruvato, na efetivação do diagnóstico diferencial e ainda são de extrema utilidade diagnóstica porque a sua presença, na análise do perfil de

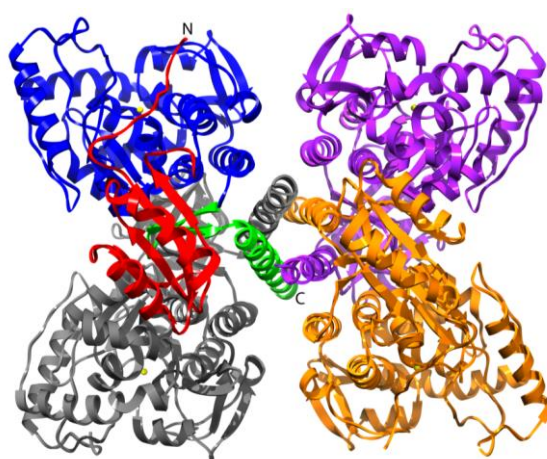
ácidos orgânicos urinários, coloca de imediato a hipótese de alteração na via metabólica da Phe e a suspeita de se tratar de um caso de PKU ou de HPA<sup>[24]</sup>.



**Figura II.2.** Via metabólica alternativa à hidroxilação da fenilalanina. A inatividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) leva à activação desta via secundária, originando compostos fenilpirúvicos. Legenda: PT – fenilalanina (histidina) transaminase.

A PAH é uma metaloenzima (Fe) tetramétrica de origem hepática, alostérica, com funções regulatórias e que apresenta cooperatividade para alguns efectores dependentes ou não de ação hormonal (ver figura II.3). A regulação homotrópica positiva da atividade enzimática da PAH é exercida pela Phe que em sinergia com a fosforilação das subunidades, induz alterações conformacionais na enzima levando ao seu estado activo e mantendo a Phe em valores fisiológicos<sup>[24]</sup>.

A reacção de hidroxilação da Phe através da acção da enzima PAH dá-se na presença de  $\text{BH}_4$ , de nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reduzido (*nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate* - **NADPH**) e necessita, ainda, da acção da enzima di-hidrobioterina redutase (*dihydrobiopterin reductase* -**DHPR**) que assegura a manutenção dos níveis de  $\text{BH}_4$  (ver Figura II.4.). Durante o processo da hidroxilação dá-se uma reacção de oxi-redução com a participação do par  $\text{BH}_4\text{-Fe}^{3+}$  de cada sub-unidade de PAH levando à formação do par  $\text{BH}_2\text{-Fe}^{2+}$ . A  $\text{BH}_4$  é uma biopterina sintetizada no organismo, sendo o produto final da via da metabolização da guanósina-trifosfato (*guanosine triphosphate* - **GTP**) (ver figura II.4)<sup>[27]</sup>.

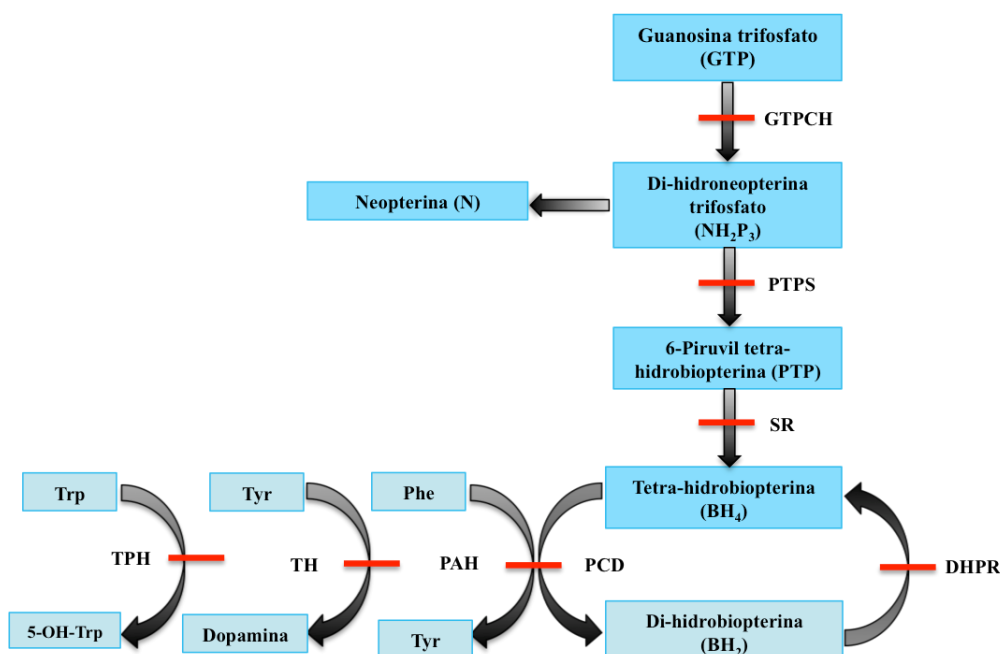


**Figura II.3.** Estrutura da enzima PAH. Esta enzima é hepática, uma metaloenzima, tetramétrica e alostérica. Adaptado de Flatmark, T., Stevens, R. C., 1999.<sup>[28]</sup>

Alterações geneticamente determinadas nas enzimas – guanósina trifosfato ciclo-hidrolase (*guanosine triphosphate cyclohydrolase* – **GTPCH**); piruvil-tetra-hidrobioterina (*pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase* – **PTPS**) e sepiapterina reductase (*sepiapterin reductase* – **SR**) - intervenientes na via de síntese da  $\text{BH}_4$  ou nas enzimas – DHPR e pterina-4<sup>a</sup>-carbinolamina desidratase

(pterin-4<sup>a</sup>-carbinolamin dehidratase - **PCD**) - intervenientes na regeneração da BH<sub>4</sub>, afetam a atividade da enzima PAH, levando ao aparecimento de um estado de hiperfenilalaninémia moderada<sup>[27]</sup>.

Contudo, representam situações muito mais graves dado as enzimas tirosina hidroxilase (tyrosine hydroxylase – **TH**) e triptofano hidroxilase (tryptophan hydroxylase – **TPH**) (ver figura II.4) serem igualmente afectadas devido ao défice em BH<sub>4</sub>, o co-factor das três hidroxilases, implicando assim a depleção de neurotransmissores<sup>[27]</sup>.



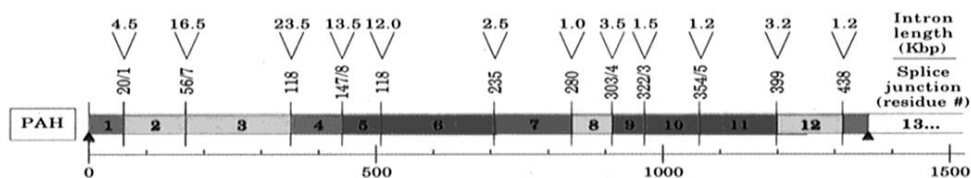
**Figura II.4.** Via de síntese e regeneração da tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Ver texto para abreviaturas.

### 2.1.3 Genética

O gene da *PAH* consiste em 13 exões e respetivos intrões<sup>[9,29]</sup>, e encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 12<sup>[9-30]</sup> (ver Figura II.5).

A PKU, sendo de transmissão autossómica recessiva, manifesta-se apenas na presença de dois alelos mutados. As duas mutações podem ocorrer em

qualquer um dos 13 exões, na *splice junction* entre os intrões intervenientes e, teoricamente, noutras áreas do gene tal como a zona promotora, contudo ainda não foram identificadas mutações nesta região do gene<sup>[8]</sup>.



**Figura II.5.** Gene da PAH humana. Os traços verticais representam as ligações intrão / exão, e as setas indicam o comprimento dos intrões. O número de resíduos de aminoácidos na *splice junction* é também indicado. Adaptado de Kappock, T. J., Caradonna J. P., 1996.<sup>[30]</sup>

Aqueles que possuem apenas uma mutação no gene da *PAH*, são simplesmente portadores (chamados *carriers*) e não apresentam nenhuma das características bioquímicas e clínicas da doença.

A “Human PAH Mutation Knowledgebase”<sup>[9]</sup> — base de dados das mutações que ocorrem naturalmente no gene humano da *PAH* - compilada recentemente, inclui um total de 548 mutações identificadas para este gene<sup>[31]</sup>. Cerca de 50% destas mutações são mutações *missense*, sendo este o tipo de mutação mais comum no gene *PAH*, seguindo-se as de *splice junction* que constituem cerca de 10% das mutações identificadas<sup>[32]</sup>.

A posição e natureza da mutação dita o efeito na perda de actividade da enzima *PAH*, que por sua vez determina o fenótipo clínico e bioquímico do doente. O fenótipo clássico de PKU está associado a uma actividade enzimática da *PAH* inexistente ou francamente reduzida. É necessário ter em conta que mutações diversas, entre as 548 já descritas, inibem a actividade da *PAH* apenas parcialmente, dando origem a uma PKU ou HPA moderada ou mesmo ligeira<sup>[32]</sup>. É

de salientar que apenas 5% das mutações identificadas não afectam ou afectam de forma ligeira a actividade enzimática da enzima PAH<sup>[33]</sup>.

A maioria dos doentes com actividade deficiente da PAH são heterozigotos compostos, deste modo possuindo duas mutações distintas. É de realçar que não existe uma mutação mais prevalente, contudo tem-se verificado que dentro da mesma população existem algumas mutações que são mais comuns<sup>[34]</sup>.

## 2.2 MSUD

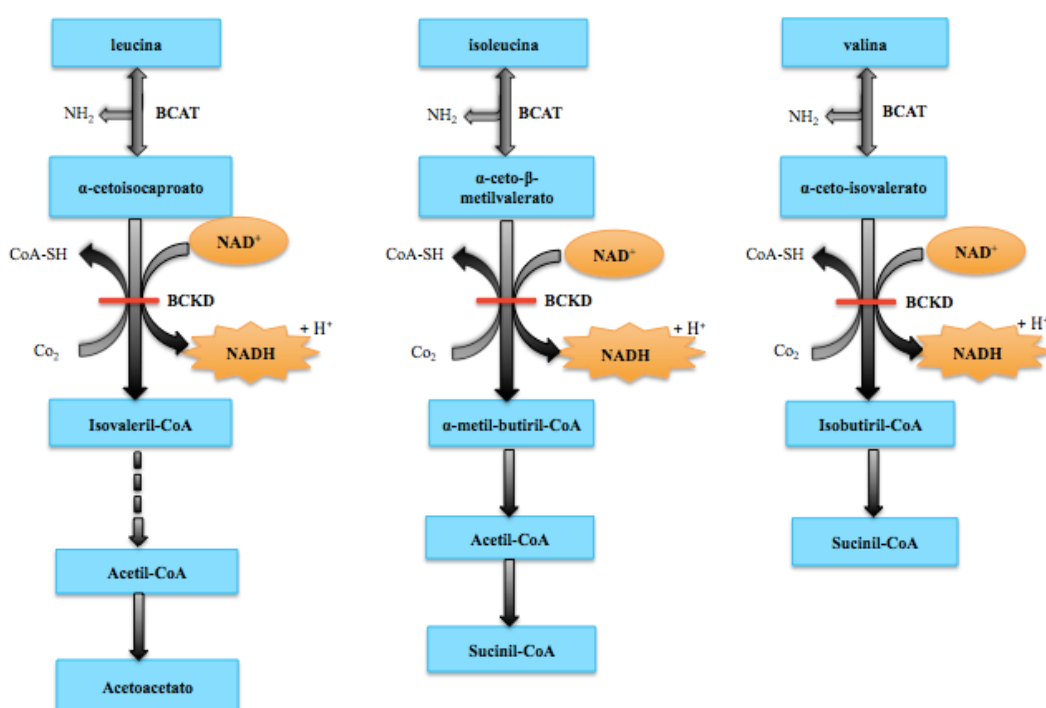
A leucínose foi descrita pela primeira vez em 1954 por *Menkes, Hurst e Craig*<sup>[35]</sup>. Trata-se de uma doença hereditária do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (*branched chain amino acids* - **BCAAs**) causada pelo défice de actividade do complexo enzimático responsável pela descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada (*branched chain ketoacids* - **BCKs**). O bloqueio enzimático resulta na acumulação dos BCKs, bem como dos respectivos BCAAs<sup>[36]</sup>.

Estima-se que a frequência mundial de MSUD seja de 1:185.000 recém-nascidos. Em certas populações como os *Menonites*, presentes em certos estados americanos, estes valores estimam-se serem superiores a 1:176 devido à presença de elevada consanguinidade<sup>[37]</sup>.

Curiosamente, em Portugal, a incidência de MSUD é bastante superior às das outras populações Europeias e Americanas; cerca de 1:113.000 recém-nascidos. Pensa-se que esta incidência se prende com o facto de existirem grandes comunidades ciganas, em Portugal, portadoras de mutações patogénicas nos genes que codificam as sub-unidades do complexo enzimático envolvido na *MSUD*<sup>[38]</sup>.

### 2.2.1 Fisiopatologia

A MSUD é uma patologia causada pela diminuição de actividade do complexo enzimático da desidrogenase dos cetoácidos de cadeia ramificada (*branched chain ketoacid dehydrogenase* - **BCKD**), a segunda enzima na via catabólica dos três aminoácidos ramificados: leucina (*leucine* -**Leu**); isoleucina (*isoleucine* - **Ile**) e valina (*valine* - **Val**)<sup>[39]</sup> (ver figura II.6).



**Figura II.6.** Via metabólica dos aminoácidos ramificados – leucina, valina e isoleucina. A enzima α-ceto-desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD) actua na segunda etapa desta via, convertendo os aminoácidos ramificados. Nos indivíduos com MSUD, a enzima BCKD encontra-se com actividade inexistente ou baixa, levando assim á acumulação destes aminoácidos até níveis incompatíveis com a vida. Adaptado de *Elsas L.J., Acosta P.B., 1999.*<sup>[41]</sup>

A fisiopatologia desta doença é essencialmente causada pela toxicidade da Leu e do ceto-ácido correspondente, o ácido α-cetoisocapróico (*α-ketoisocaproic acid* – **αKIC**), nos tecidos e órgãos onde se acumula, daí a denominação de Leucínose como sinónimo de MSUD. Deste modo, os sintomas e sinais de



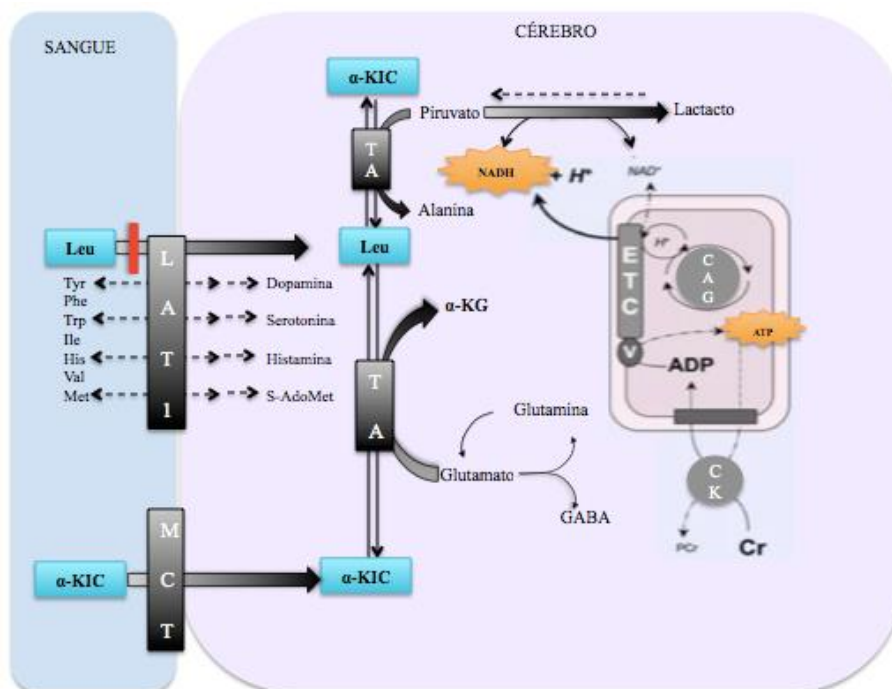
intoxicação metabólica tornam-se aparentes na presença de concentrações plasmáticas de Leu relativamente baixas, enquanto que a presença de níveis elevados de Val e Ile nos fluidos biológicos parece não estar associada a alterações clínicas e bioquímicas, pelo menos, a curto prazo<sup>[40]</sup>.

A neurotoxicidade da Leu parece, em parte, estar relacionada com a sua capacidade de interferir com o transporte (ver figura II.7) de outros aminoácidos neutros (*large neutral amino acids* – **LNAA**)<sup>[25]</sup> na barreira hematoencefálica, reduzindo a *pool* de aminoácidos no cérebro precursores dos neurotransmissores e de outras moléculas essenciais. Os cetoácidos que se acumulam e passam a barreira hematoencefálica exercem a sua toxicidade interferindo com as reacções de transaminação quer no cérebro quer no músculo esquelético.

Os episódios mais graves de intoxicação bioquímica são devidos ao catabolismo proteico endógeno que pode ser induzido por situações diversas: infecções, jejum prolongado, exercício físico e situações de stresse, tais como intervenções cirúrgicas. Crianças e adultos com episódios agudos sofrem de fadiga muscular, dor epigástrica e vômitos; a disfunção neurológica aguda manifesta-se por diminuição da capacidade cognitiva, anorexia, distúrbios no sono, hiperactividade, alucinações, distónia e ataxia<sup>[42]</sup>.

Os BCAAs, sendo aminoácidos essenciais, são fornecidos pela dieta e possuem um papel fundamental na regulação do balanço proteico corporal e, ainda, são uma fonte importante quer de azoto para a síntese de alanina e glutamina quer de energia. Os BCAAs representam aproximadamente 35% - 40% dos aminoácidos essenciais no músculo esquelético. Existem evidências que demonstram que os

BCAAs não só aumentam a velocidade da síntese proteica mas também a capacidade celular do processo de síntese<sup>[36]</sup>.



**Figura II.7.** Esquema ilustrativo do transporte da Leu e do α-KIC (α-cetoisocaproato) através da barreira hematoencefálica (*Blood Brain Barrier-BBB*). Adaptado de Sgaravatti AM et al., 2003.<sup>[43]</sup>

Assim, aos BCAAs atribui-se um papel anabolizante no músculo esquelético, em repouso. Este efeito, parece ser mediado por alterações nas vias de sinalização que controlam a síntese proteica. Os dados existentes sugerem que, em particular, a Leu, estimula a síntese proteica no músculo esquelético aumentando quer a actividade quer a síntese das proteínas envolvidas na translação do mRNA<sup>[41]</sup>.

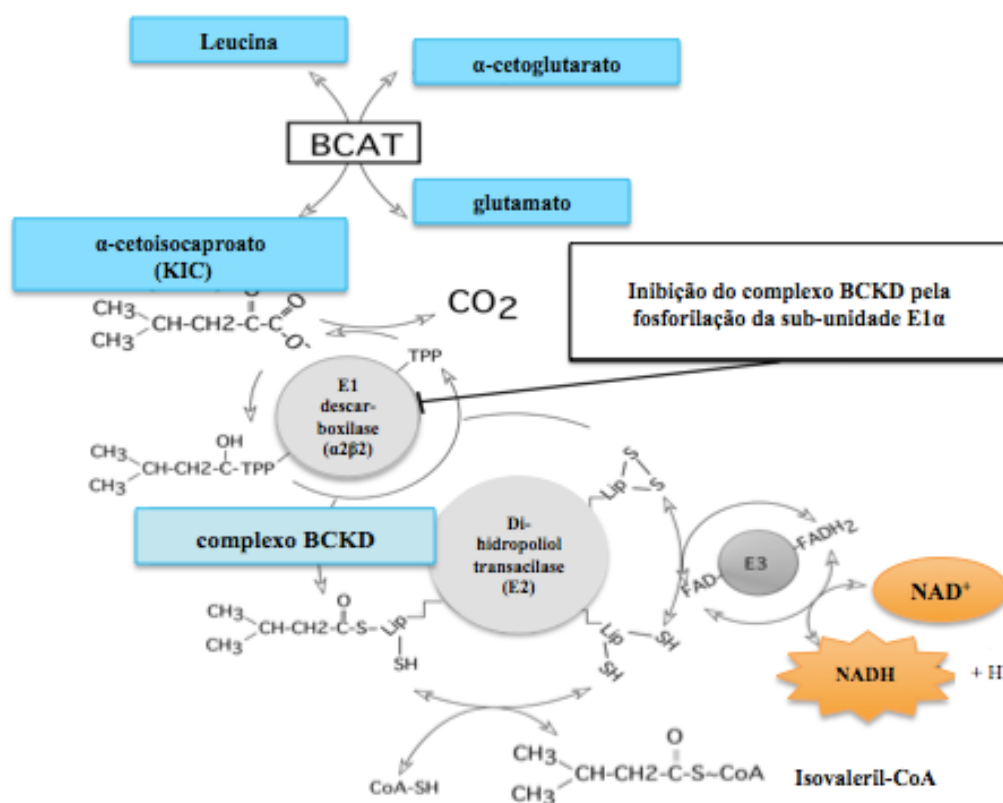
Os BCAAs são também activamente utilizados como fonte de energia, em alternativa aos lípidos e hidratos de carbono, por diversos órgãos e tecidos. No fígado, a metabolização total dos BCAAs fornece uma quantidade significativa de acetil-CoA e acetoacetato para a síntese de corpos cetónicos a serem usados pelo

cérebro nos períodos de jejum ou quando existe depleção de glucose<sup>[41]</sup>.

O passo inicial do catabolismo dos aminoácidos aromáticos – Leu, Val e Ile - é uma reacção de transaminação, fosfato de piridoxal dependente, como verificado em todas as reacções de transaminação, reversível e que leva à formação dos respectivos cetoácidos de cadeia ramificada (branched chain ketoacids – **BCKAs**): ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (proveniente da Leu), ácido  $\alpha$ -ceto-3-metilvalérico (proveniente da Ile) e ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico (proveniente da Val)<sup>[41]</sup>.

O segundo passo da metabolização processa-se através de uma descarboxilação oxidativa irreversível catalisada pela BCKD (ver figura II.6) que se encontra localizada na superfície interna da membrana interna da mitocôndria<sup>[41]</sup>.

A BCKD é uma macromolécula multi-enzimática (ver figura II.8) que possui três componentes catalíticos, designados por: E1, E2 e E3. O componente E1 é constituído por quatro sub-unidades: duas E1 $\alpha$  e duas E1 $\beta$ , formando um heterotetramero. Os componentes catalíticos requerem a presença do co-factor tiamina pirofosfato (tiamine pyrophosphate - **TPP**) - a E1 é uma descarboxilase, TPP dependente – da flavina adenina dinucleótido (**FAD**) – a E3 é uma flavoproteína, assim como de um grupo prostético, o ácido lipóico – constituinte dos polipéptidos que formam a E2, que actua como uma transacilase - e, ainda, de duas enzimas reguladoras, uma cinase e uma fosfatase que de forma reversível fosforilam / desfosforilam, respectivamente inactivando / activando o complexo enzimático<sup>[44]</sup>.



**Figura II.8.** Complexo enzimático da desidrogenase dos cetoácidos de cadeia ramificada (*branched chain ketoacid dehydrogenase* – **BCKD**). Ver texto para as abreviaturas. Adaptado de Lynch C.L. et al., 2003 <sup>[45]</sup>.

A MSUD tem formas de apresentação distintas<sup>[46]</sup>. A forma mais comum é a forma clássica<sup>[47-49]</sup>, tipo grave, a qual se manifesta no recém-nascido após um intervalo livre curto, 48-72h. Contudo, um odor a “*maple syrup*” (proveniente dos cetoácidos) pode ser detectado, nas primeiras 24h de vida, nos fluidos biológicos, o que de imediato constitui um sinal de suspeita da presença da patologia.

Os níveis dos BCAAs, essencialmente da Leu, encontram-se extremamente elevados e a actividade enzimática da BCKD é praticamente inexistente. As outras formas de MSUD podem aparecer na infância ou na idade

escolar e são menos graves e comuns e classificam-se em quatro tipos / variantes:

- Intermitente, a segunda forma mais comum, não se apresenta no período neonatal, apresenta sintomatologia neurológica e a actividade do complexo enzimático parece variar entre 3% a 30% da do valor de referência<sup>[44,50]</sup>;
- Moderada (ou sub-aguda), não apresenta sintomatologia fora das situações de stress catabólico nas quais entram em descompensação. A actividade do complexo enzimático pode atingir os 50% da actividade normal. Os casos descritos, fora dos períodos de crise, apresentam boa tolerância a dieta sem restrição proteica<sup>[50]</sup>;
- Respondedora à tiamina, são formas muito raras e aparecem acompanhadas com acidose láctica dada a sub-unidade E3, TPP dependente, do complexo da BCKD, ser comum ao complexo enzimático da piruvato desidrogenase. A administração de tiamina (20-50 mg / 24h) paralelamente com uma dieta pobre em Leu permite a normalização dos valores plasmáticos dos aminoácidos ramificados<sup>[44,40]</sup>;
- Deficiência em di-hidrolipoil desidrogenase (E<sub>3</sub>): esta forma de MSUD é devida a uma deficiência na sub-unidade E<sub>3</sub> do complexo da BCKD. Esta forma é muito rara e parecem existir apenas 20 casos descritos. Dado esta subunidade ser a mesma do complexo da piruvato desidrogenase, a deficiência surge acompanhada de acidose láctica persistente, para além da acumulação dos BCAAs. O quadro clínico é semelhante ao da forma intermitente.

### 2.2.2 Genética

A MSUD é uma doença metabólica hereditária de transmissão autossómica recessiva que se apresenta com cetoacidose, deterioração neurológica progressiva e com um odor na urina de “*maple syrup*” ou xarope de açúcar.

Esta doença, como já referido, é causada pela deficiente actividade do complexo enzimático BCKDC<sup>[36]</sup>.

Este complexo encontra-se codificado por quatro genes nucleares: 1) gene  $E1\alpha$  (*BCKDHA*), localizado no cromossoma 19q13.1-q13.2, expande-se por 55 kb e contém 9 exões; 2) gene  $E1\beta$  (*BCKDHB*), localizado no cromossoma 6p21-p22, estende-se por 100 kb e contém 11 exões; 3) gene  $E2$  (*DBT*), localizado no cromossoma 1p31, estende-se por 68 kb e contém 11 exões; 4) gene  $E3$  (*DLD*), localizado no cromossoma 7q31-q32, expande-se por 20 kb e contém 14 exões<sup>[50,52-54]</sup>.

Dos 4 componentes da BCKCD, as mutações ocorrem mais frequentemente no componente  $E1\alpha$ <sup>[41]</sup>. Apesar das alterações genómicas que alteram a actividade da BCKD poderem ocorrer em qualquer um dos seus componentes catalíticos, ambos os alelos num locus de um gene devem conter alterações nucleotídicas. Frequentemente, mutações *missense* resultam em alterações de aminoácidos idênticos, oferecendo informação valiosa para determinar o seu efeito na subunidade catalítica<sup>[37]</sup>. Estão hoje descritas cerca de 150 mutações distintas que se dividem entre os genes  $E1\alpha$ ,  $E1\beta$  e  $E2$ . Cerca de 75 % dos casos descritos enquadram-se na forma clássica da doença<sup>[36,50,52]</sup>.

### 2.3. Testes de Diagnóstico para a PKU e MSUD

A PKU e a MSUD fazem parte do painel de patologias que são rastreados no período neonatal. O rastreio da PKU, iniciou-se na década de 60-70 do século passado, através de um teste de inibição bacteriana desenvolvido por Guthrie e que passou a ser conhecido como o teste de Guthrie<sup>[17-19]</sup>. Rapidamente, foram aplicadas outras metodologias: imunoensaios usando a detecção fluorimétrica, a análise cromatográfica de aminoácidos e na viragem do século 20 foi introduzida a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS-MS). A aplicação da LC-MS-MS na análise de diversos metabolitos permitiu a expansão do rastreio a outras patologias, entre elas, a leucínose.

O rastreio da PKU iniciou-se, em Portugal, em massa, em 1982 e actualmente cobre 99,9% dos recém-nascidos. Em Portugal, o rastreio neonatal da leucínose iniciou-se em 2004 / 2005.

Os recém-nascidos (RN) com PKU ou com leucínose não apresentam quaisquer sinais ou sintomas das respectivas patologias. Durante a gravidez, a mãe é capaz de metabolizar os aminoácidos que o feto não consegue degradar. Deste modo, torna-se necessário que o RN seja submetido a uma carga proteica, sendo o leite materno ou de fórmula, suficientes para induzirem a acumulação dos aminoácidos que o organismo não consegue metabolizar. Por esta razão, o teste é efectuado entre o 3º e 7º dia de vida.

Em Portugal o teste é conhecido por *teste do pézinho*, dado que a picada é feita no calcanhar do bebé para obtenção de gotas de sangue que são impregnadas em papel de filtro próprio para o efeito. Esta forma de colher as amostras de sangue, facilita a efectivação dos testes, uma vez que agiliza todo o processo,

evitando a deslocação do RN e facilitando enormemente o transporte da amostra, dado que o cartão é enviado por correio regular para o laboratório que a irá processar.

Nas formas agudas e graves de leucinose pode aparecer sintomatologia antes da efectivação do rastreio. Os biomarcadores específicos destas duas aminoacidopatias são: no caso da PKU, o aminoácido Phe e no caso da leucinose os BCKAs e a allo-isoleucina, metabolito que só aparece nos casos de MSUD<sup>[37,40,51]</sup>. Deste modo, teores plasmáticos elevados dos aminoácidos referidos fazem o diagnóstico inequívoco. Será depois reconfirmado bioquimicamente e caracterizado molecularmente. A identificação da(s) mutação(ões) é de extrema utilidade para que se possa oferecer ao casal em risco a possibilidade de um rastreio pré-natal numa gravidez futura.



## 2.4 Tratamento

### 2.4.1 PKU

#### Recomendações nutricionais gerais

Uma vez que a sintomatologia clínica desta patologia está associada a concentrações plasmáticas elevadas de Phe<sup>[56]</sup>, o controlo do aporte deste aminoácido deve ser feito de forma sistemática e rigorosa. Para tal, recorre-se ao auxílio de dietas hipoproteicas e à substituição de alimentos ricos neste aminoácido por outros pobres ou isentos do mesmo. Esta substituição deve ter em conta o aporte nutricional adequado a cada faixa etária. Misturas de aminoácidos semi-sintéticas são largamente utilizadas dado que permitem um maior controlo do aporte nutricional<sup>[56-58]</sup>.

É hoje consensual, que a terapia dietética seja instituída apenas quando os valores plasmáticos de Phe sejam iguais ou superiores a 6 mg/dl (363,24 µM; v. ref.: 120 µM), assim, para valores de Phe ao rastreio de 3 a 6 mg/dL (181,62-363,24 µM) recomenda-se a monitorização mensal do teor de Phe plasmática e caso se verifique alteração nos níveis de plasmáticos de Phe a introdução da terapia dietética deve ser considerada<sup>[22]</sup>.

É da maior importância que a tolerância do doente à quantidade de Phe ingerida seja aferida correctamente dado que vai determinar o teor proteico permitido na dieta. A tolerância do doente define-se como o aporte máximo de Phe que permite manter um controlo metabólico dentro dos parâmetros aceites para o doente em causa<sup>[56]</sup>. As recomendações nutricionais para os doentes PKU são as apresentadas na tabela II.1.

**Tabela II.1.** Recomendações nutricionais para os doentes com PKU. Adaptado de *MacDonald A. et al.*, 2011.<sup>[56]</sup>

Idade	< 6 m	7-12 m	1-4 a	4-7 a	7-11 a	11-15 a	15-19 a
Energia <b>Kcal/kg/dia</b>	95-145	80-135	-	-	-	-	-
<b>Kcal/dia</b>	-	-	1300	1700	2400	2200-2700	1800-2100
Proteínas totais <sup>a</sup> <b>g/kg/dia</b>	3-3,5	2,5-3	-	-	-	-	-
<b>g/dia</b>			30	35	40	50-55	50-65
Glicídios <b>% VET</b>	30-35	30-35	30-35	30-35	50-60	50-60	50-60
Lípidos <b>% VET</b>	50	50	50	50	35	35	35
Fenilalanina <b>mg/kg/dia</b>	20-70	15-50	15-40	15-35	15-30	15-30	10-30
Tirosina <b>mg/kg/dia</b>	300-350	250-300	230	175	140	110-120	110-120
Água <b>ml/kg/dia</b>	135-160	120-145	95	90	75	50-55	50-65

<sup>a</sup> O cálculo das proteínas globais inclui as proteínas intactas e a mistura de aminoácidos.

Legenda: VET – valor energético total; a – anos; m – meses.

### Recomendações nas descompensações metabólicas

As concentrações plasmáticas de Phe podem aumentar de forma: directa, devido a incumprimento do plano alimentar instituído; ou indirecta, por diminuição do aporte energético e / ou da mistura de aminoácidos, no decurso de infecções ou quando há regressão na curva de crescimento<sup>[59]</sup>.

Nestas situações, recorre-se ao aumento do aporte energético através do aumento do aporte de glícidos, lípidos e da mistura de aminoácidos. Estas estratégias podem reduzir os valores de Phe até 60-80 mg/dia. O doseamento dos

BCAAs poderá ser útil, no ajuste da dieta, uma vez que permitem detectar a presença de um estado catabólico que pode ser atribuído a malnutrição proteica<sup>[56]</sup>.

### Recomendações a longo prazo

A abordagem terapêutica inicial, embora de forma ligeira, pode variar de acordo com os valores de Phe no momento do rastreio<sup>[56]</sup>. Assim, quando os valores apresentados são  $> 20$  mg/dL ( $1.210,8 \mu\text{M}$ ), recomenda-se uma pausa no aporte de Phe durante 48-72 h. A suspensão das fontes naturais de Phe, leite materno ou fórmula, não deve ser superior ao período referido uma vez que a sua contribuição em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa é da maior importância no desenvolvimento harmonioso do recém-nascido / criança<sup>[22,60]</sup>.

De forma a que se garantam as necessidades proteicas e energéticas nestes doentes, recorre-se a uma mistura de aminoácidos isenta de Phe e suplementada com maltodextrina e / ou óleo de milho, ou com uma mistura de ambas as fontes energéticas (glicídica e lipídica)<sup>[22,61]</sup>.

Com a introdução dos procedimentos mencionados, habitualmente, consegue-se uma descida rápida dos valores plasmáticos de Phe, na ordem dos 6-7 mg/dL/dia. A reintrodução da Phe na dieta é efectuada tendo em consideração os valores plasmáticos da Phe, podendo atingir um máximo de 75 mg/kg/dia<sup>[56]</sup>.

A mistura de aminoácidos é valiosa no tratamento da PKU, uma vez que constitui uma importante fonte de azoto, sendo essencial para alcançar um bom controlo metabólico. Nas formas clássicas da patologia, a mistura de aminoácidos pode ser responsável pelo fornecimento de cerca de 50 a 90% do aporte proteico<sup>[56]</sup>.

Uma vez que outros aminoácidos, como já referido, tais como a Tyr, a Val e a treonina partilham o mesmo transportador (ver figura II.7) da Phe na

barreira hematoencefálica<sup>[25]</sup>, a sua administração tem sido usada na tentativa de diminuir a passagem da Phe para o cérebro, dado que haverá competição para o transportador entre a Phe e os outros aminoácidos. Em Portugal, esta terapêutica foi testada em adolescentes e adultos, tendo apresentado resultados satisfatórios, principalmente nos casos em que existia menor adesão ao plano alimentar<sup>[25,56]</sup>. As recomendações referentes à preparação das misturas em função do teor proteico são apresentadas no quadro II.2.

**Quadro II.2.** Recomendações para a mistura de aminoácidos nos doentes com PKU. Adaptado de *Recommendations on the dietary management of phenylketonuria*, 1993<sup>[62]</sup>.

Recomendações para a mistura de aminoácidos		
Idade	< 12 meses	> 12 meses
Teor de aminoácidos	3 g/kg/dia <sup>a</sup>	1-2 g/kg/dia

<sup>a</sup> esta recomendação pode ser alargada até aos 24 meses de idade

É também importante a forma como a mistura de aminoácidos é ingerida. A toma deve ser repartida por 3 vezes por dia, de modo a garantir uma boa distribuição energética dos macronutrientes, garantindo assim a optimização dos processos anabólicos<sup>[63]</sup>. Tradicionalmente as misturas de aminoácidos são apresentadas em pó em embalagens de 0,5 Kg-1Kg, no entanto têm surgido novas formas de apresentação, nomeadamente: em saquetas, em barras, em comprimidos ou na forma líquida. Estas permitem uma maior flexibilidade da dieta, uma vez que são facilmente transportadas, sendo uma excelente alternativa a utilizar na escola ou no trabalho<sup>[64]</sup>.

As recomendações para a diversificação alimentar nos doentes PKU são

semelhantes às preconizadas para as crianças saudáveis, excepto no que refere a restrição dos alimentos proteicos. No auxílio desta tarefa são usadas tabelas que permitem calcular a quantidade de alimentos segundo os teores respectivos em Phe. O peso do alimento que fornece 20 mg de Phe é equivalente a uma porção ou parte a fim de facilitar a elaboração do plano alimentar diário<sup>[22]</sup>.

Presentemente, a alternativa ao tratamento dietético na PKU, por défice enzimático da PAH, será a administração do seu co-factor - BH<sub>4</sub><sup>[58,65]</sup>. Contudo, cada doente é um caso e não respondem todos da mesma forma. Parece ter alguma eficácia nas formas moderadas. Os primeiros passos nesta área estão a começar a ser dados em Portugal. Num futuro próximo haverá resultados inerente à experiência de tratamento dos doentes Portugueses com a BH<sub>4</sub> (*sapropterin*, nos USA e Kuvan, na Europa).

### Monitorização

À semelhança de outras doenças crónicas, a monitorização do tratamento é crucial e determinante para o prognóstico. Existem procedimentos internacionais e nacionais com as recomendações referentes à periodicidade da avaliação clínica (ver quadro II.3), e dos doseamentos sanguíneos de Phe, seguindo, estes últimos, as recomendações americanas<sup>[67]</sup>, apresentadas no quadro II.4.

Nos doentes PKU sob tratamento dietético, os valores plasmáticos de Phe desejáveis devem manter-se entre os 2 - 6 mg/dl (121,08-363,24 µM) até aos 12 anos e entre os 2 - 8 mg/dl (121,08-484,32 µM) para idades superiores<sup>[22]</sup>. A Phe é responsável por 90% da síntese endógena de Tyr<sup>[24]</sup> e como tal é da maior importância a monitorização do teor plasmático deste aminoácido a fim de se evitar

a deficiência do mesmo.

**Quadro II.3.** Periodicidade recomendada de avaliação clínica nos doentes com PKU. Adaptado de *NIH, 2000*.<sup>[67]</sup>

<b>Idade</b>	<b>Periodicidade</b>
< 6 meses	mensal
6-12 meses	bimestral
1-3 anos	trimestral
3-12 anos	trianual
> 13 anos	bianual

Diversos parâmetros bioquímicos - vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub><sup>[59,68-71]</sup>, selénio<sup>[59,68]</sup>, ácido fólico<sup>[74-75]</sup>, carnitina<sup>[71]</sup>, colesterol<sup>[73]</sup>, triacilgliceróis<sup>[32]</sup>, cálcio, fósforo, ferro, zinco<sup>[59,68]</sup>, IGF1, pré-albumina, ureia e creatinina<sup>[20]</sup> - são, igualmente, monitorizados periodicamente de forma a se assegurar, tanto quanto possível, o regular funcionamento dos processos metabólicos e dos sistemas envolvidos na regulação dos mesmos.

Apesar da suplementação em cálcio e fósforo tem sido descrito o risco de desenvolvimento de osteopénia<sup>[76]</sup> nestes doentes pelo que a avaliação da densidade mineral óssea é recomendada a partir dos 6 anos e deve ter em consideração a distribuição dos compartimentos corporais de acordo com os respectivos percentis.

**Quadro II.4.** Periodicidade dos doseamentos sanguíneos de fenilalanina a partir do primeiro ano de vida.

Idade	Periodicidade
< 12 meses	semanal
1-12 anos	quinzenal
> 12 anos	mensal

#### 2.4.2 MSUD

##### Recomendações nutricionais gerais

A gravidade da MSUD é condicionada pelos seus diferentes genótipos. O diagnóstico atempado e o bom controlo metabólico permitem antever um prognóstico favorável nos indivíduos com esta patologia. O tratamento dietético (ver tabela II.2), tal como para a PKU, revela-se uma ferramenta essencial na manutenção de valores plasmáticos dos BCAAs considerados aceitáveis. A restrição alimentar varia consoante a idade, a taxa de crescimento e a gravidade do défice enzimático<sup>[46]</sup>.

O ácido  $\alpha$ -isocapróico, produto da reacção de transaminação da Leu, e a própria Leu parecem estar na origem das crises encefalopáticas. Neste sentido, é de extrema importância o controlo dos níveis plasmáticos de Leu<sup>[40]</sup>. A tolerância do doente à Leu é definida como o aporte máximo de Leu tolerado que permite manter um controlo metabólico dentro de valores tão próximo quanto possível da normalidade<sup>[46]</sup>.

**Tabela II.2.** Recomendações nutricionais para os doentes com MSUD. Adaptado de J. César et al., 2007<sup>[46]</sup>.

Idade	< 6 m	6-12 m	1-4 a	4-7 a	7-11 a	11-15 a	15-19 a
Energia <b>Kcal/kg/dia</b>	95-150	80-135	-	-	-	-	-
<b>Kcal/dia</b>	-	-	1300	1700	2400	2200-2700	1800-2100
Proteínas totais <sup>a</sup> <b>g/kg/dia</b>	3-3,5	2,5-3	-	-	-	-	-
<b>g/dia</b>	-	-	30	35	40	50-55	50-65
Glicídios <b>% VET</b>	30-35	30-35	30-35	30-35	50-60	50-60	50-60
Lípidos <b>% VET</b>	50	50	50	50	35	35	35
Leucina <b>mg/kg/dia</b>	60-100	40-75	40-70	35-63	30-60	30-50	15-40
Isoleucina <b>mg/kg/dia</b>	30-90	30-90	20-85	20-80	20-30	20-30	10-30
Valina <b>mg/kg/dia</b>	40-95	30-60	30-85	30-50	25-30	20-30	15-30
Água <b>ml/kg/dia</b>	135-160	120-145	95	90	75	50-55	50-60

<sup>a</sup> O cálculo das proteínas globais inclui as proteínas intactas e a mistura de aminoácidos.

Legenda: VET – valor energético total; a – anos; m – meses

Nas formas clássicas de MSUD, a tolerância à Leu varia entre 300-400 mg / dia nos recém-nascidos e 500-700 mg / dia nas restantes idades. Tal como acontece na PKU, é necessária uma fonte proteica isenta de BCAAs (mistura de aminoácidos), de modo a se garantir as necessidades proteicas totais do doente<sup>[36,77]</sup>. As recomendações referentes ao teor proteico / mistura de aminoácidos são apresentadas no quadro II.5.



Apesar da importância da administração destas misturas de aminoácidos, a taxa de crescimento das crianças nem sempre é a desejada, e pensa-se que seja devido à rápida oxidação dos aminoácidos das misturas os quais são posteriormente excretados na urina sob a forma de ureia. As recomendações da toma são semelhantes às da PKU<sup>[63]</sup>.

A palatibilidade das misturas sintéticas de aminoácidos é um aspecto que tem que ser tido em consideração e que é difícil de ser melhorado. A fim de se ultrapassar esta dificuldade a mistura sintética de aminoácidos é misturada com outros alimentos do plano alimentar que atenuam, tanto quanto possível, o sabor desagradável das mesmas.

#### Recomendações nutricionais na fase aguda

O principal objectivo é o de rapidamente eliminar os metabolitos tóxicos acumulados no plasma, de modo a proteger o cérebro de lesões irreversíveis. A urgência da intervenção é máxima dado que a manutenção de valores plasmáticos sistematicamente superiores a 1000  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[79-80]</sup> tem um impacto negativo no desenvolvimento cognitivo dos doentes. A ausência de intervenção precoce e eficaz irá seguramente levar a danos cerebrais irreversíveis ou mesmo à morte.

Nestas situações são utilizados dois métodos: a depuração exógena - utiliza técnicas como a transfusão prolongada exsanguínea, a diálise peritoneal, a hemodiafiltração, a hemodiálise intermitente e a hemofiltração - e a depuração endógena - indução do anabolismo seguido de início imediato de nutrição entérica

rica em glícidos, lípidos e com fórmula isenta de BCAAs ou de suporte nutricional parentérico<sup>[82-84]</sup>.

**Quadro II.5.** Recomendações para a mistura de aminoácidos nos doentes com MSUD. Adaptado de *Flatmark, T. e Stevens, R. C., 1999*<sup>[28]</sup>.

Idade	Teor de aminoácidos	Equivalente proteico
< 2 anos	3 g/kg/dia	2,5 g/kg/dia
> 2 anos	2 g/kg/dia	1,7g/kg/dia

O método de depuração exógena é o método mais usado uma vez que o de depuração endógena não é tão eficaz quando os valores dos BCAAs plasmáticos estão muito elevados, dado que a normalização dos valores plasmáticos de BCAAs é mais lenta<sup>[85-86]</sup>.

#### Recomendações nutricionais a longo prazo

O controlo metabólico é o principal objectivo a assegurar, garantindo um bom crescimento e maturação. Para tal, é preciso ter em conta a tolerância do doente e o fenótipo da doença.

As formas intermediárias são tratadas com o mesmo protocolo das formas clássicas, embora nos indivíduos com alguma actividade enzimática a restrição proteica é introduzida apenas nas situações de stresse metabólico.

O aporte de proteínas naturais é contabilizado de acordo com a tolerância verificada em cada situação, de maneira a garantir a manutenção dos valores bioquímicos desejáveis e as necessidades indispensáveis à realização da

síntese proteica. No recém-nascido e crianças, este aporte é assegurado pelo aleitamento materno, leites ou fórmulas adaptados.

Mais tarde, a diversificação alimentar segue as recomendações para as crianças saudáveis, embora haja necessidade de retirar os alimentos ricos em proteínas tais como os alimentos de origem animal, as leguminosas secas e os frutos secos<sup>[77]</sup>. Para garantir o controlo metabólico da doença é conveniente utilizar uma tabela de equivalentes de Leu, a qual permite separar os alimentos consoante o seu teor neste aminoácido. Uma parte/porção de Leu corresponde ao peso do alimento que fornece 50 mg de Leu<sup>[46]</sup>. As recomendações de glícidos e lípidos são as mesmas que para as crianças sem patologia.

#### Recomendações nutricionais nas descompensações metabólicas

O tratamento dietético, nomeadamente a restrição proteica imposta, é essencial para a obtenção de uma evolução favorável nestes doentes, garantindo o seu crescimento e desenvolvimento de forma adequada. No entanto, mesmo nos indivíduos bem controlados, é frequente surgirem descompensações metabólicas. À semelhança do que acontece noutros períodos de crescimento destes doentes, as descompensações devem-se ao aumento dos níveis de Leu a ponto de causarem toxicidade, que se reflecte de forma negativa a nível cognitivo. As razões para o aumento plasmático deste aminoácido são várias, destacando-se possíveis erros alimentares e o catabolismo proteico desencadeado por: infecções, vacinas, jejum prolongado, anorexia, vômitos e diarreia<sup>[46]</sup>. A presença de cetonúria sugere catabolismo sendo um parâmetro a monitorizar nestas situações.

Algumas das medidas preventivas utilizadas passam por reforçar o aporte glicídico e lipídico, restringindo ou interrompendo (por períodos que não ultrapassem as 48 horas) a ingestão de alimentos com proteínas naturais, mantendo contudo a mistura de aminoácidos isenta de BCAAs. Esta mistura permite o aporte de aminoácidos neutros como o Trp, a Tyr, a metionina (*methionine* - **Met**) e a Phe. Estes, parecem competir com a Leu, não permitindo a sua concentração em excesso no cérebro, assegurando assim os processos de síntese e evitando o agravamento da disfunção neurológica<sup>[8,25]</sup>.

Nesta medida, podem ser aplicados dois tipos de dieta: uma dieta de semi - urgência, aplicada em estados de pirexia; e uma dieta de urgência, aplicada quando ocorrem hospitalizações desencadeadas por vômitos e anorexia grave e acompanhadas de deterioração clínica<sup>[46]</sup>.

### Monitorização

Nos doentes com MSUD, a periodicidade do seguimento de consultas é a descrita no quadro II.6. Contudo, pode ser necessário adaptar-se o calendário das consultas dependendo da gravidade e frequência das descompensações. O tratamento a ser mantido a longo prazo terá como objectivo principal a manutenção das concentrações plasmáticas o mais próximo possível da normalidade. Os valores desejáveis são: Leucina: 80-200  $\mu\text{M}$ <sup>[81]</sup>; Isoleucina: 40-90  $\mu\text{M}$ <sup>[46]</sup>; Valina: 200-245  $\mu\text{M}$ <sup>[77]</sup>.

**Quadro II.6.** Periodicidade recomendada das consultas nos doentes com MSUD. Adaptado de J. César et al., 2007<sup>[46]</sup>.

<b>Idade</b>	<b>Periodicidade</b>
< 2 meses	semanal
2-24 meses	mensal
> 25 meses	trimestral

Os doseamentos dos BCAAs e de outros parâmetros bioquímicos são realizados com diferentes periodicidades e é recomendado a medição dos teores de IGF1, pré-albumina, imunoglobulina, zinco, selénio, vitaminas lipossolúveis, ácido fólico e as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub><sup>[46]</sup>; assim como a densitometria óssea, cuja prática deve ser feita a partir dos 6 anos, de modo a avaliar a evolução no ganho de densidade mineral óssea. A composição corporal é também de extrema importância, assim como a realização do exame neurológico e da avaliação do desenvolvimento psicomotor.

## 2.5 Stresse oxidante

Durante os processos metabólicos as células produzem substâncias instáveis potencialmente perigosas denominadas de espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*- **ROS**) como, por exemplo, o radical hidroxilo, o ião superóxido e o peróxido de hidrogénio; e espécies reactivas de azoto (*reactive nitrogen species* - **RNS**) como, por exemplo, o peroxinitrito e o monóxido de azoto. Os ROS e os RNS possuem uma dupla função, sendo espécies benéficas ou

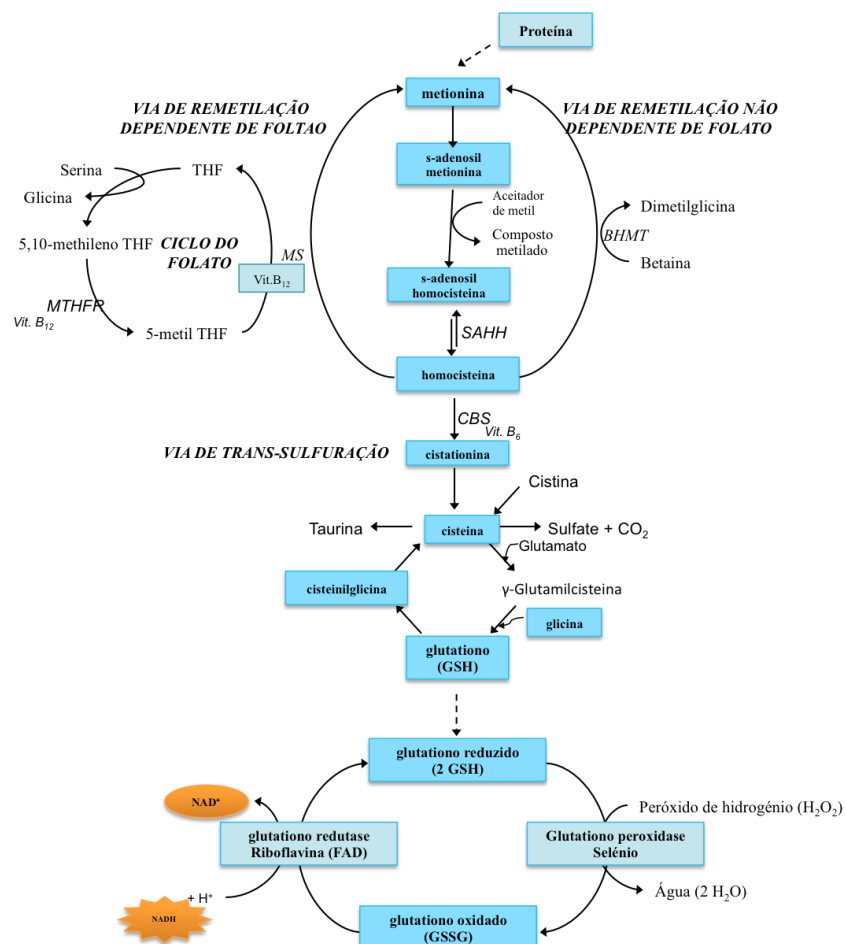
nefastas. Este balanço é de extrema importância para os seres vivos e está dependente de regulação. Os efeitos potencialmente nefastos associados a estas substâncias são resultado de um desequilíbrio entre o aumento da produção de RS e a capacidade do sistema anti - oxidante, constituído por antioxidantes endógenos e sistemas enzimáticos, que pode resultar em stresse oxidante.

A produção descontrolada de RS resulta no aumento de lesões a estruturas celulares e macromoléculas várias, incluindo o ADN. Os antioxidantes neutralizam as RS, impedindo um aumento descontrolado dos mesmos e, consequentemente, as lesões referidas.

Apesar dos conhecidos benefícios da introdução de uma dieta baixa em proteínas naturais, quer nos doentes PKU quer nos com MSUD, a fim de se reduzir a ingestão dos aminoácidos que não são passíveis de serem metabolizados, este tipo de terapia pode conduzir a um aumento do risco de deficiências nutricionais, nomeadamente, no que diz respeito aos antioxidantes quando as suplementações com vitaminas, minerais e outros nutrientes essenciais não são cumpridas.

O glutathione (*glutathione* - **GSH**) é um antioxidante não enzimático e o maior tiol e tampão *redox* celular, abundante no citoplasma, núcleo e mitocôndria. No organismo o GSH é sintetizado numa série de reacções bioquímicas que requerem a presença dos aminoácidos precursores – glutamato, cisteína, e glicina – e, ainda, de ATP e magnésio (ver figura II.9). Os precursores podem ser obtidos através de alimentos como a fruta, vegetais, cereais, chá verde, vinho tinto, óleos vegetais, entre outros. Consequentemente, a dieta pode modular o teor de antioxidantes e influenciar, embora que indirectamente, a capacidade antioxidante endógena das células.

Nestes doentes, o risco de se desencadear um estado de stresse oxidante pode estar relacionado, essencialmente, com dois factores: 1) a restrição dietética a que os doentes estão sujeitos ou 2) à produção excessiva de RS devido à doença em si ou aos metabolitos associados que se acumulam nos diversos tecidos e órgãos. É também de salientar que o carácter restritivo da terapêutica alimentar pode conduzir a uma diminuição da adesão à mesma contribuindo assim para um risco acrescido em deficiência de nutrientes essenciais. Estudos em animais e em humanos têm demonstrado que uma nutrição proteica adequada é fundamental na manutenção da homeostasia do GSH<sup>[89]</sup>.



**Figura II. 9** Via metabólica da Met-Hcy-GSH.

De facto, estudos diversos têm chamado a atenção para o binómio stress oxidante - deficiência em GSH, o qual pode ter um papel chave na patogénese de diversas patologias, incluindo os EHM. Nos doentes PKU<sup>[90]</sup> e MSUD<sup>[91]</sup>, o incumprimento da suplementação em nutrientes essenciais e / ou a dieta com restrição em proteína natural têm sido associadas a desequilíbrios nos perfis de stress oxidante nestes doentes. O melhor conhecimento do impacto da dieta na regulação do metabolismo do GSH, nomeadamente na biodisponibilidade da cisteína, é da maior importância para que seja possível desenvolver-se estratégias que aumentem a eficácia do tratamento destas patologias.



## **CAPÍTULO III**

### *Objetivos*



## 1. OBJECTIVOS

Avaliar, numa população aleatória de amostras de plasmas de doentes com PKU e MSUD, sob tratamento dietético, biomarcadores directa e indirectamente relacionados com o processo de destoxificação celular – o sistema antioxidante – a fim de se inferir o potencial papel dos marcadores estudados no processo de controlo de eficácia da terapêutica dietética e de possibilitar o desenho de um estudo que permita validar os dados exploratórios encontrados.

No desenvolvimento do trabalho foram ainda focados os seguintes pontos:

- avaliação do teor de tióis: cisteína total, cisteinil-glicina, glutathione, cistina livre;
- avaliação de precursores e ou determinantes da glutathione: metionina, homocisteína e glicina;
- avaliação do ácido metilmalónico (*methylmalonic acid* – **MMA**), biomarcador que actua como indicador precoce de deficiência em VitB<sub>12</sub>, a qual tem um papel vital na remetilação da homocisteína a metionina;
- avaliação das possíveis intercorrelações existentes entre os metabolitos analisados

Numa população de amostras de plasma, existentes no laboratório, pertencentes a doentes PKU e MSUD, sob dieta proteica. Amostras enviadas ao laboratório para o regular controlo dos biomarcadores específicos das respectivas

patologias, respectivamente a fenilalanina e os aminoácidos ramificados tendo como finalidade o reajuste da dieta.

## **CAPÍTULO IV**

### *População e Métodos*



## **1. MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.1 Amostra estudada**

Neste estudo, amostras de plasma de doentes PKU e de doentes com leucínose recebidas no laboratório para análise dos biomarcadores respectivos - Phe e aminoácidos ramificados (Leu, Ile, Val e Allo-Ile)-, no período entre 2011 e 2013, devidamente armazenadas a – 20°C, foram usadas quer para análise de parâmetros não determinados quer para o levantamento de dados analíticos, nomeadamente referentes aos teores dos aminoácidos avaliados à data da colheita.

Estas amostras referem-se a 21 doentes PKU e a 8 doentes com leucínose, todos sujeitos a tratamento dietético específico: restrição da proteína natural com baixo teor do(s) aminoácido(s) que não são metabolizados, suplementação com outros aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e outros nutrientes essenciais. Os dados não foram cruzados com os processos individuais dos doentes. Apenas se consegue inferir, face aos valores dos aminoácidos – Phe e BCAAs – que algumas das amostras terão sido colhidas em situação de descompensação / crise. O estudo efectuado foi um estudo cego. Pretendeu-se, apenas, obter dados, digamos que exploratórios, que viessem ou não alertar para a necessidade de estudos futuros aleatórios que permitissem validar o significado dos parâmetros bioquímicos avaliados nas medidas terapêuticas dietéticas, no prognóstico e prevenção de deficiência em metabolitos e co-factores específicos.

Assim, em 74 amostras de 21 doentes PKU e em 109 amostras de 8 doentes com Leucínose, avaliaram-se os seguintes parâmetros bioquímicos:

- Tióis: Glutationo total (tGSH); cisteinilglicina (**Cys-Gly**) – produto da metabolização do glutatióno; cisteína total (**tCys**) – precursor do glutatióno; homocisteína total (**tHcy**) – precursor da cisteína e consequentemente do glutatióno e ainda a cistina livre (**l(Cys)<sub>2</sub>**).
- Aminoácidos: Met – precursor da Hcy e consequentemente da cisteína e a glicina – a qual faz parte da estrutura da molécula do glutatióno ( $\gamma$ -gutamil-cisteinil-glicina).
- Ácido metilmalónico: biomarcador preditivo da deficiência em Vit B<sub>12</sub>, com um papel crucial na via da remetilação da Hcy a Met

## 1.2. Métodos

Os métodos analíticos usados foram os que se encontram em uso no laboratório de Met&Gen.FFUL, onde se desenvolveu o projecto. Todos os métodos usados neste estudo foram desenvolvidos e optimizados no laboratório onde se efectuaram os estudos metabólicos e estão submetidos a controlo de qualidade externo ERNDIMQA ([www.erndimqa.nl](http://www.erndimqa.nl)). Assim, apenas, de uma forma breve se faz referência aos métodos usados.

### Aminoácidos

Foram analisados por cromatografia capilar de alta resolução em fase gasosa (*gas-chromatography* - **GC**) acoplada a um detector de ionização de chama (*flame ionization detector*- **FID**), usando o sistema de preparação das amostras e de análise para GC-FID da Ez:faast, Phenomenex, DE. Usou-se como padrão interno a



norvalina. Os controlos internos, *pool* de plasma preparada no laboratório, dividida em alíquotas de 250 µl, armazenadas a - 20°C até serem utilizadas, assim como uma mistura de padrões, na concentração de 200 µM / aminoácido, foram analisadas paralelamente com cada grupo de amostras analisadas. Esta estratégia permite ao laboratório manter em estreito controlo a análise quantitativa dos metabolitos em causa. É ainda de referir que o laboratório participa no controlo de qualidade externo Europeu, designado por ERNDIM (European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of of Inherited disorders of Metabolism).

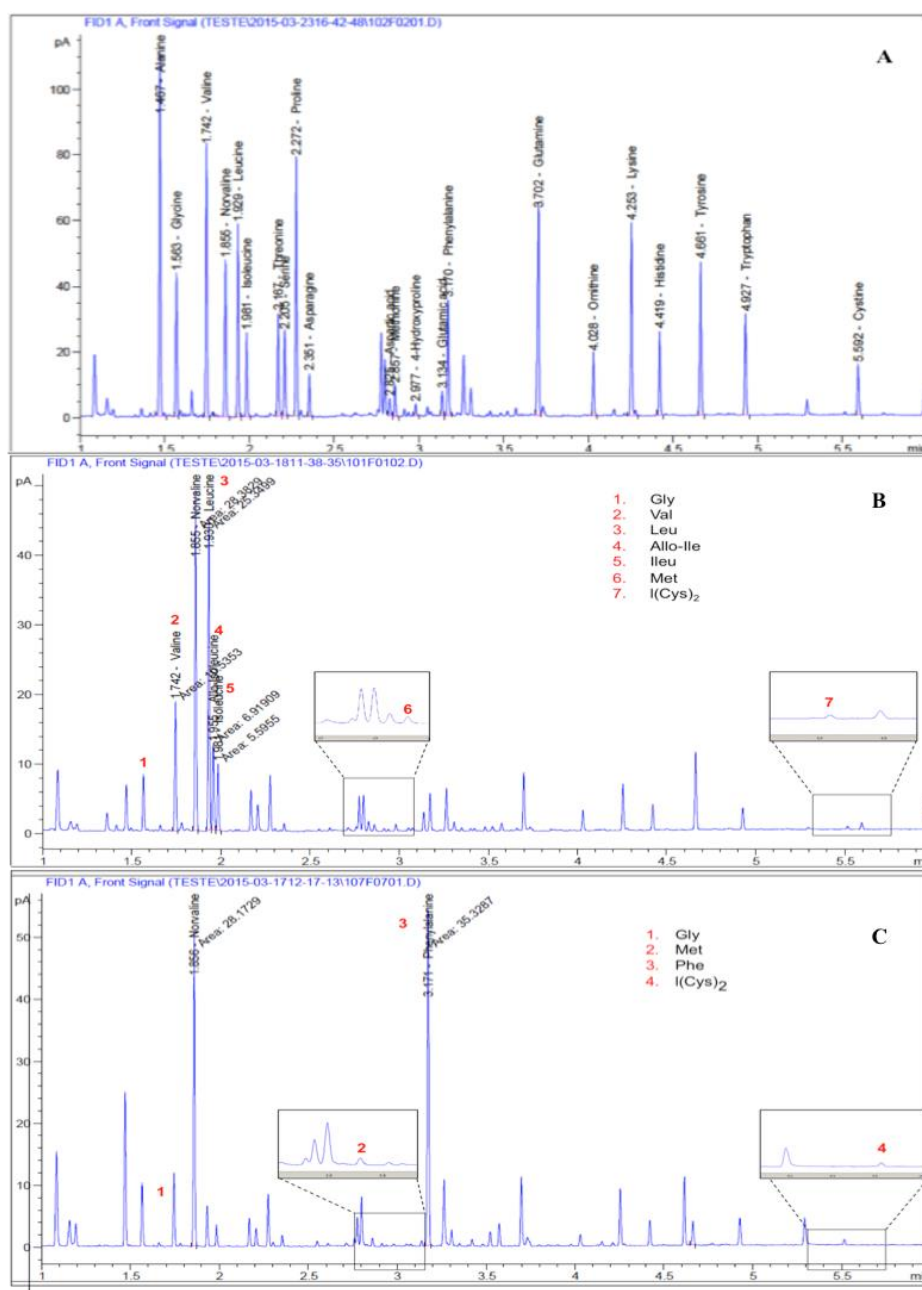
O perfil de aminoácidos plasmáticos de uma amostra analisada é ilustrado na figura IV.1, a título de exemplo. Na altura da análise, embora se tenha obtido o perfil completo, apenas tinham sido determinados os teores de Phe e Tyr nos doentes PKU, e de Leu, Ile, Val e Allo-Ile, nos doentes com Leucinose. Dado os cromatogramas ficarem armazenados na base de dados de cromatogramas do laboratório, os cromatogramas correspondentes às amostras em estudo foram reanalisados para cálculo do teor de Met, Gly e l(Cys)<sub>2</sub> (cistina livre).

## **Tióis**

Foram analisados por cromatografia líquida de alta pressão, em fase reversa, com sistema de gradiente isocrático e detecção fluorimétrica ( $\lambda$  exc = 385 nm;  $\lambda$  em = 515 nm) dos derivados 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato, método adaptado do método *gold-standard*<sup>[88]</sup> usado para a Hcy.

A análise cromatográfica foi efectuada numa coluna C<sub>18</sub>, Supelcosil LC-18\_S, 25 cm X 4,6 mm, 5 µM, tendo sido utilizada como fase móvel tampão de

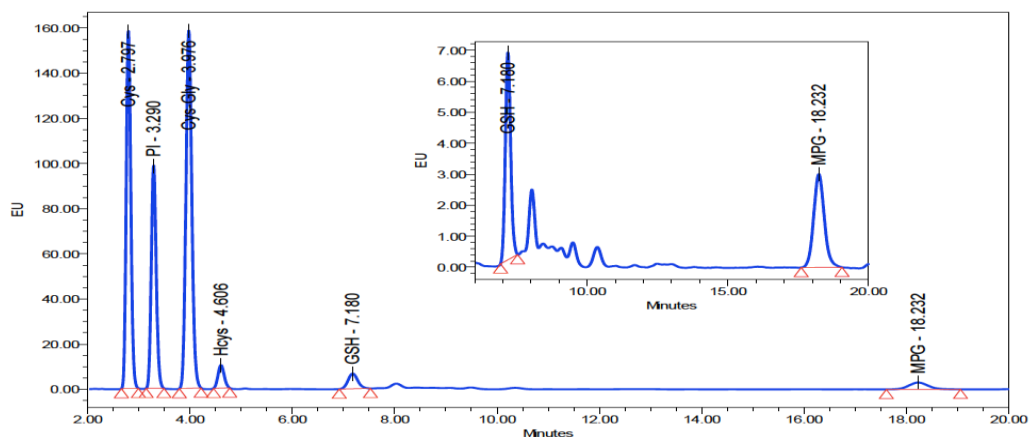
di-hidrogenofosfato de potássio 0,1M, pH 2,10 e acetonitrilo (95; 5; v:v) e um fluxo de 1,6 ml / min.



**Figura IV.1.** Perfil cromatográfico de uma solução padrão (A) e de amostras de aminoácidos plasmáticos de um doente com MSUD (B) e de um doente PKU(C). Gly-glicina; Val-valina; Leu – leucina; Allo-Ile – allo-isoleucina; Ile – isoleucina; Met – metionina; (Cys)<sub>2</sub> – cistina.

As amostras foram descongeladas, homogeneizadas por agitação em vórtex, de onde se retiraram 100 µl de plasma, aos quais se adicionou os dois padrões internos – cisteamina (10 µl, 25 µM) e **MPG** (2- Mercaptoprionilglicina) (25 µM), usados respectivamente na quantificação da tHcy, tCys e Cys-Gly e do tGSH.; e 10 µl da mistura de TBP (tri-n-butil-fosfina) em **DMF** (dimetilformamida), agente reductor utilizado para a redução de todas as formas oxidadas de homocisteína, glutatono e cistina. Assim, determinou-se a tHcy, tGSH, tCys, ou seja, as formas reduzidas e oxidadas destes metabolitos e ainda a cisteinilglicina.

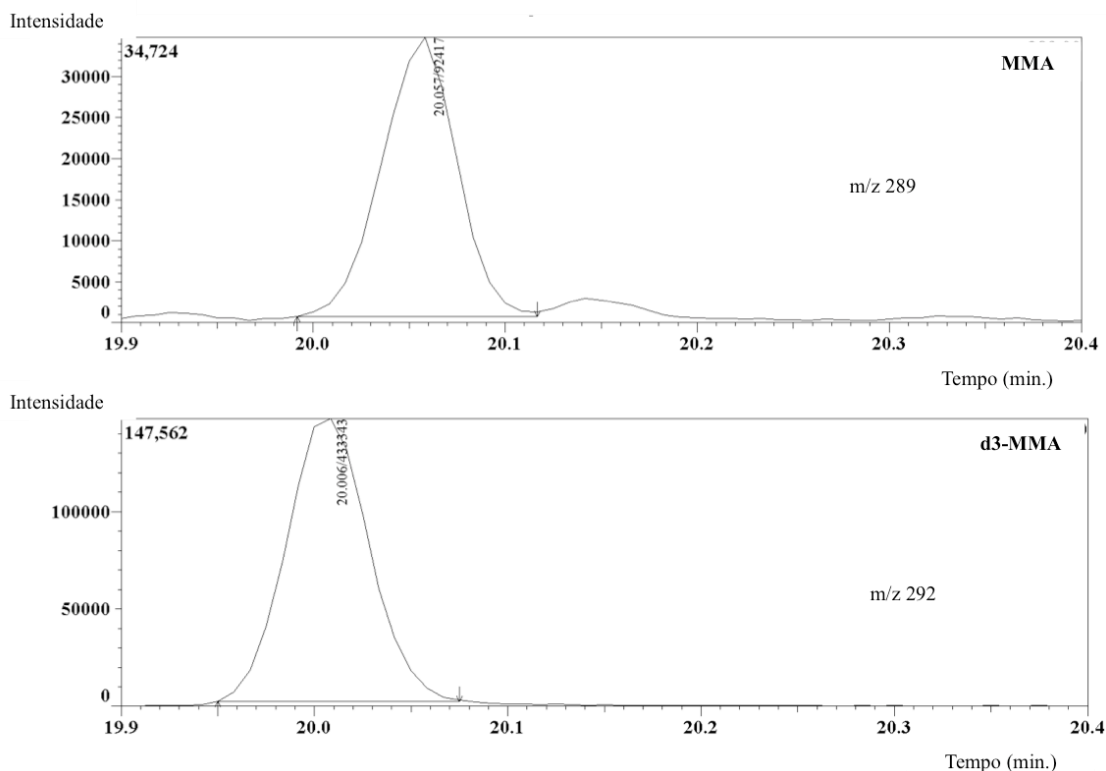
Após redução da amostra, procedeu-se à desproteinização em meio ácido e à formação dos derivados, através da adição de 50 µl do **SBDF** (ácido 7-fluor-benzofurazano-sulfónico), usado como reagente de derivação. Os derivados formados foram posteriormente injectados para análise. A figura IV.2 mostra, como exemplo, um perfil cromatográfico de tióis de uma amostra de plasma. A quantificação foi efectuada em função do padrão interno usado e das misturas de padrões puros com concentrações conhecidas. Cada grupo de amostras foi analisado em paralelo com as amostras padrão.



**Figura IV.2.** Perfil cromatográfico de tióis plasmáticos. Hcy – homocisteína; Cys-Gly – cisteinilglicina; GSH – glutatono; Cys – cisteína; PI – padrão interno; MPG – 2-mercaptopropionilglicina, usado como padrão interno na quantificação do GSH.

### Ácido Metilmalônico (MMA)

Foi analisado por cromatografia gasosa capilar acoplado à espectrometria de massa (GC-MS), em modo SIM. Método desenvolvido e otimizado no laboratório (a ser submetido para publicação), a fim de aumentar a sensibilidade do mesmo, o MMA foi analisado na forma de derivados **MTBSTFA** (N-metil-N-(ter-butildimetil(silil)trifluoracetamida)), usando como padrão interno o MMA marcado com deutério ( $d_3$ -MMA). O método mostrou ser linear na gama de 0 a 4  $\mu$ M, gama de interesse dado o limite superior do valor de referência ser 0,4  $\mu$ M. Na figura IV.3 é apresentado um cromatograma tipo.



**Figura IV.3.** Cromatograma com monitorização em SIM de uma amostra de plasma. Foram monitorizados os iões  $m/z$  289 (MMA) e 292 ( $d_3$ -MMA), respectivamente correspondentes ao pico do MMA e ao pico do padrão  $d_3$ -MMA.

### **Análise Estatística:**

As análises efectuadas neste estudo foram realizadas com o auxílio do programa *GraphPad Prism software V6.00* (La Jolla, USA).

O teste *t* de *student* bilateral para amostras não emparelhadas foi usado para comparar os valores obtidos entre grupos de metabolitos das amostras analisadas, respectivamente as amostras de doentes PKU e de MSUD. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (*standart deviation -SD*). As correlações foram efectuadas usando o coeficiente de correlação de *Pearson*. Um valor de *p* inferior a 0.05 foi considerado significativo.



## **CAPÍTULO V**

### *Resultados e Discussão*





## 1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis plasmáticos de diversos tióis e precursores ou metabolitos afins foram analisados em 74 amostras de plasma de doentes com diagnóstico comprovado de PKU e em 109 amostras de plasma de doentes com diagnóstico de leucínose. Estas amostras foram colhidas para avaliação dos marcadores patognomónicos das patologias referidas.

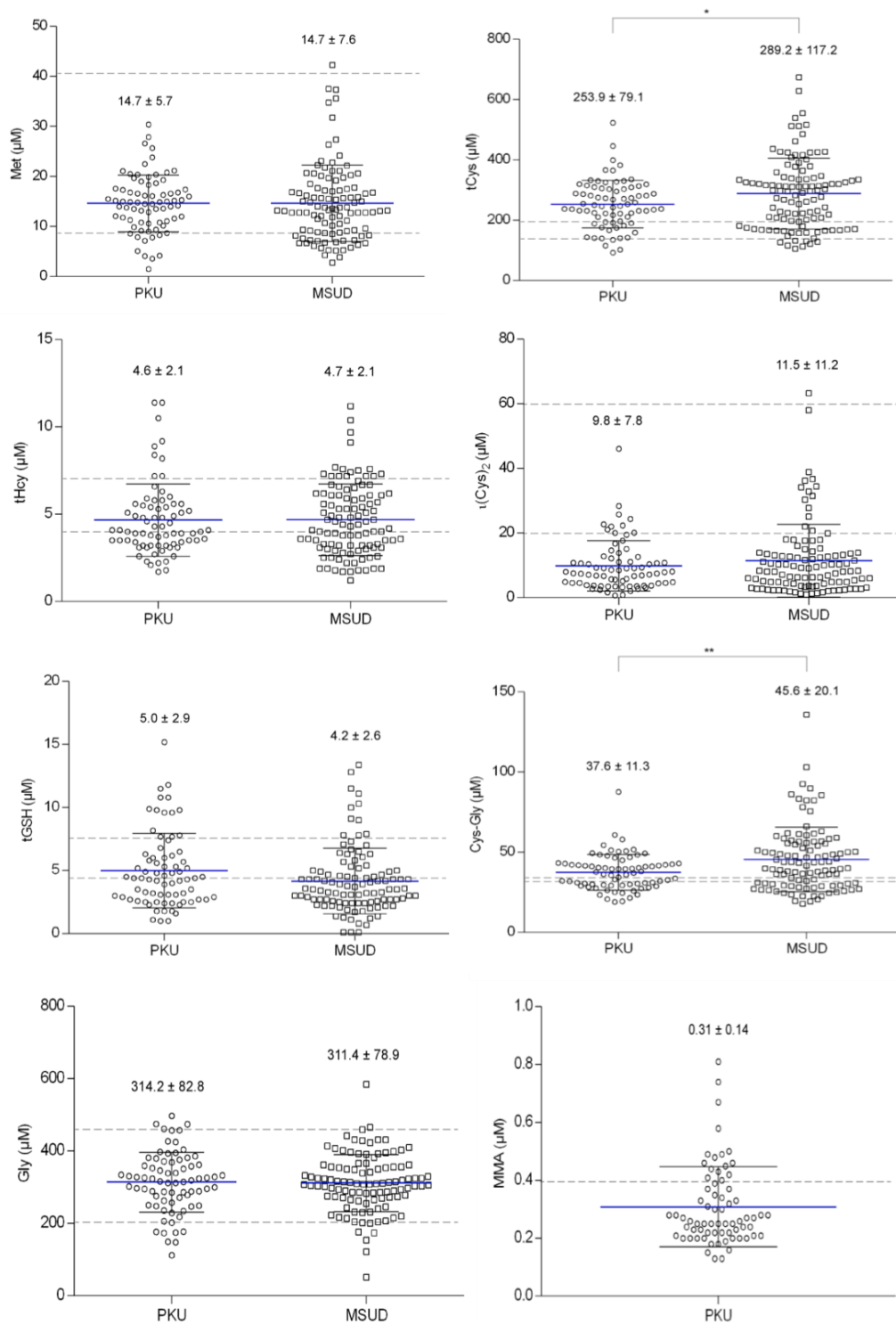
No nosso estudo, os resultados dos biomarcadores analisados em ambos os conjuntos de amostras, PKU e MSUD, apresentam-se na figura V.1.

Na tabela V.1. resume-se os valores médios, mínimo e máximo para o conjunto de biomarcadores analisados referentes às amostras dos doentes PKU e MSUD, respectivamente.

**Tabela V.1** Biomarcadores plasmáticos avaliados na população de amostras PKU e MSUD: média e valor mínimo e máximo

Amostras	Met ( $\mu$ M)	tHcy ( $\mu$ M)	l(Cys) <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	tCys ( $\mu$ M)	tGSH ( $\mu$ M)	Cys-Gly ( $\mu$ M)	Gly ( $\mu$ M)	MMA ( $\mu$ M)
<b>PKU</b> (n=74)	<b>14,7</b> (1,5 - 30,4)	<b>4,6</b> (1,7 - 11,4)	<b>9,8</b> (0,7 - 46,1)	<b>253,9</b> (93,1 - 523,4)	<b>5</b> (1,0 - 15,2)	<b>37,6</b> (19,1 - 87,7)	<b>314,2</b> (112,4 - 497,5)	<b>0,31</b> (0,13 - 0,81)
<b>MSUD</b> (n=109)	<b>14,7</b> (2,8 - 42,7)	<b>4,7</b> (1,2 - 11,2)	<b>11,5</b> (1,0 - 63,3)	<b>289,2</b> (105,4-674,1)	<b>4,2</b> (0,1 - 12,8)	<b>45,6</b> (19,4 - 135,9)	<b>311,4</b> (51,9 - 585,0)	-
v.r. <sup>a</sup> (min-máx.)	8,7- 40,9	4,0 – 7,0	20 - 60	140 - 198	4,4 – 7,6	32 - 34	227,8 – 514,2	< 0,4

n-número de amostras; <sup>a</sup>- valor de referência; Met- metionina; tHcy-homocisteína total; l(Cys)<sub>2</sub>- cistina livre; tCys-cisteína total; tGSH – glutatióno total; Cys-Gly- cisteinilglicina; Gly – glicina; MMA – ácido metilmalónico



**Figura V.1.** Comparações entre os biomarcadores analisados nas amostras de PKU e de MSUD. Legenda: \*  $p < 0.0249$ ; \*\*  $p < 0.0024$ .

Nos anexos encontram-se os valores individuais de cada amostra estando organizadas as tabelas por grupo de amostras pertencentes ao mesmo doente. Entre os parâmetros bioquímicos determinados comuns às amostras PKU e amostras MSUD, encontrámos uma diferença com significância, apenas, para a tCys ( $p<0.0249$ ) e Cys-Gly ( $p<0.0024$ ). Curiosamente, os valores médios dos restantes biomarcadores revelaram ser muito semelhantes entre si, assim como, a distribuição dos valores em relação à média (ver figura V.1.). Mais ainda, a percentagem de amostras (ver tabela V.2.), em cada grupo, que revelaram para os mesmos biomarcadores valores inferiores ao valor mínimo de referência é igualmente semelhante.

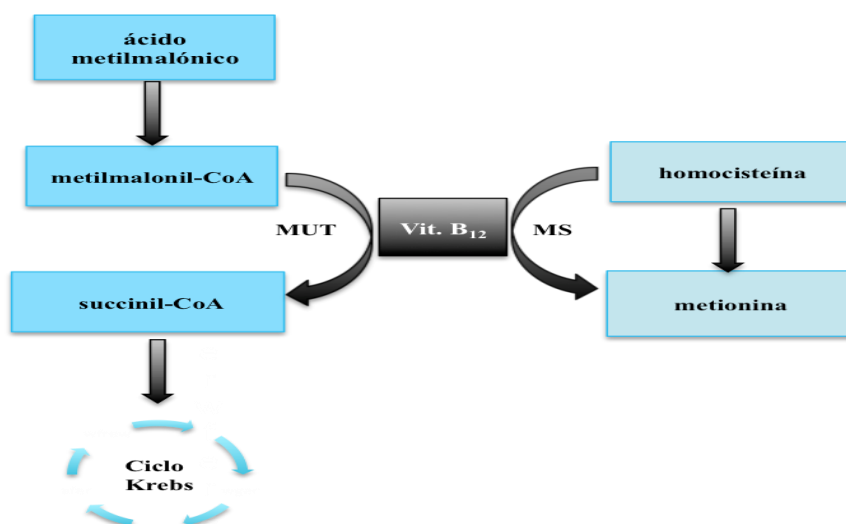
**Tabela V.2.** Percentagem (%) de amostras por biomarcador em cada grupo estudado, PKU e MSUD, que revelaram valores dos biomarcadores estudados inferiores ao limite mínimo do valor de referência e do valor máximo de referência para a tHcy e MMA (a vermelho).

Amostras	Biomarcador								
	Met (%)	tHcy (%)	I(Cys)2 (%)	tCys (%)	tGSH (%)	Cys-Gly (%)	Gly (%)	tHcy (%)	MMA (%)
<b>PKU</b> (n=74)	13,5 ↓	47,3 ↓	86,4 ↓	5,4 ↓	48,6 ↓	36,5 ↓	13,5 ↓	12,1 ↑	28,4 ↑
<b>MSUD</b> (n=109)	22,0 ↓	41,2 ↓	87,2 ↓	7,3 ↓	67,9 ↓	28,4 ↓	13,8 ↓	13,8 ↑	-

n - número de amostras

É, ainda, interessante a constatação de que a percentagem (ver tabela V.2., dados a vermelho) de amostras com valores de tHcy acima do limite superior do valor de referência, de acordo com a idade (< 7 anos), em ambos os grupos de amostras, é idêntica. Este parâmetro bioquímico é dependente do teor de VitB<sub>12</sub> (cobalamina) intracelular dado que a enzima que intervém na remetilação da Hcys a Met utiliza a VitB<sub>12</sub> como co-factor.

Se a via da trans-sulfuração estiver a funcionar em pleno, ao aumento do teor de tHcy plasmática tem sido atribuído o papel de biomarcador preditivo de deficiência em VitB<sub>12</sub>. A mesma função tem sido atribuída ao MMA, o outro metabolito cujo catabolismo é dependente da cobalamina, a qual é parte integrante do co-factor da enzima que intervém na metabolização do MMA (ver figura V.2). Contudo, este biomarcador tem sido considerado um biomarcador preditivo mais precoce da deficiência em VitB<sub>12</sub> do que a tHcy plasmática, uma vez que aparenta ser um biomarcador mais sensível às variações intracelulares de cobalamina<sup>[92]</sup>.



**Figura V.2** Vitamina B<sub>12</sub> como co-factor das enzimas metilmalónico mutase (MUT) e metionina sintase (MS).

Na população de amostras PKU, a percentagem (28,4%) de amostras com teor de MMA plasmático superior ao valor de referência duplicou quando comparado com as amostras com teor de tHcy (12,1%) acima do valor limite superior de referência. Todavia, uma correlação fortemente significativa ( $p < 0.001$ ) entre os teores plasmáticos de tHcy e MMA foi observada (ver figura V.3), o que corrobora a ideia destes biomarcadores desempenharem um papel crucial na

detecção precoce de deficiência em VitB<sub>12</sub>. Estes resultados suportam os demonstrados no estudo realizado por *Vugteveen et al*<sup>[92]</sup>, no entanto distinguem-se dos encontrados por, *Has et al*<sup>[71]</sup>, *Huemer et al*<sup>[93]</sup>, e *colomé et al*<sup>[90]</sup>, não tendo, os últimos dois estudos citados, encontrado relação alguma entre as concentrações de VitB<sub>12</sub> e as de Hcy plasmática. Estas diferenças podem ser justificadas pelas diferenças nas concentrações de VitB<sub>6</sub> e folato, que influenciam as concentrações de tHcy. No nosso estudo estes parâmetros não foram analisados.

A análise global dos resultados indica que ambos os grupos de amostras, PKU e MSUD, para os biomarcadores estudados se comportaram de forma idêntica. Estes resultados permitem, numa abordagem preliminar, especular que os parâmetros analisados não são dependentes da patologia mas sim da terapia dietética instituída dado as semelhanças entre as mesmas quanto ao tipo de suplementação em vitaminas, minerais e nutrientes essenciais.

Os resultados mostram ainda que o tGSH se encontra em valores inferiores ao do limite mínimo (4,4 µM) do valor de referência numa percentagem elevada de amostras: 48,6% no grupo de amostras PKU e 67,9% no grupo de amostras MSUD. Paralelamente, numa percentagem semelhante, os valores plasmáticos de tHcy - 47,7% e 41,2% respectivamente no grupo PKU e MSUD - assim como os de Cys-Gly - 36,5% no grupo PKU e 28,4 % no grupo MSUD - encontram-se abaixo dos valores mínimos de referência respectivos.

A depleção de tHcy pode ser atribuída a:

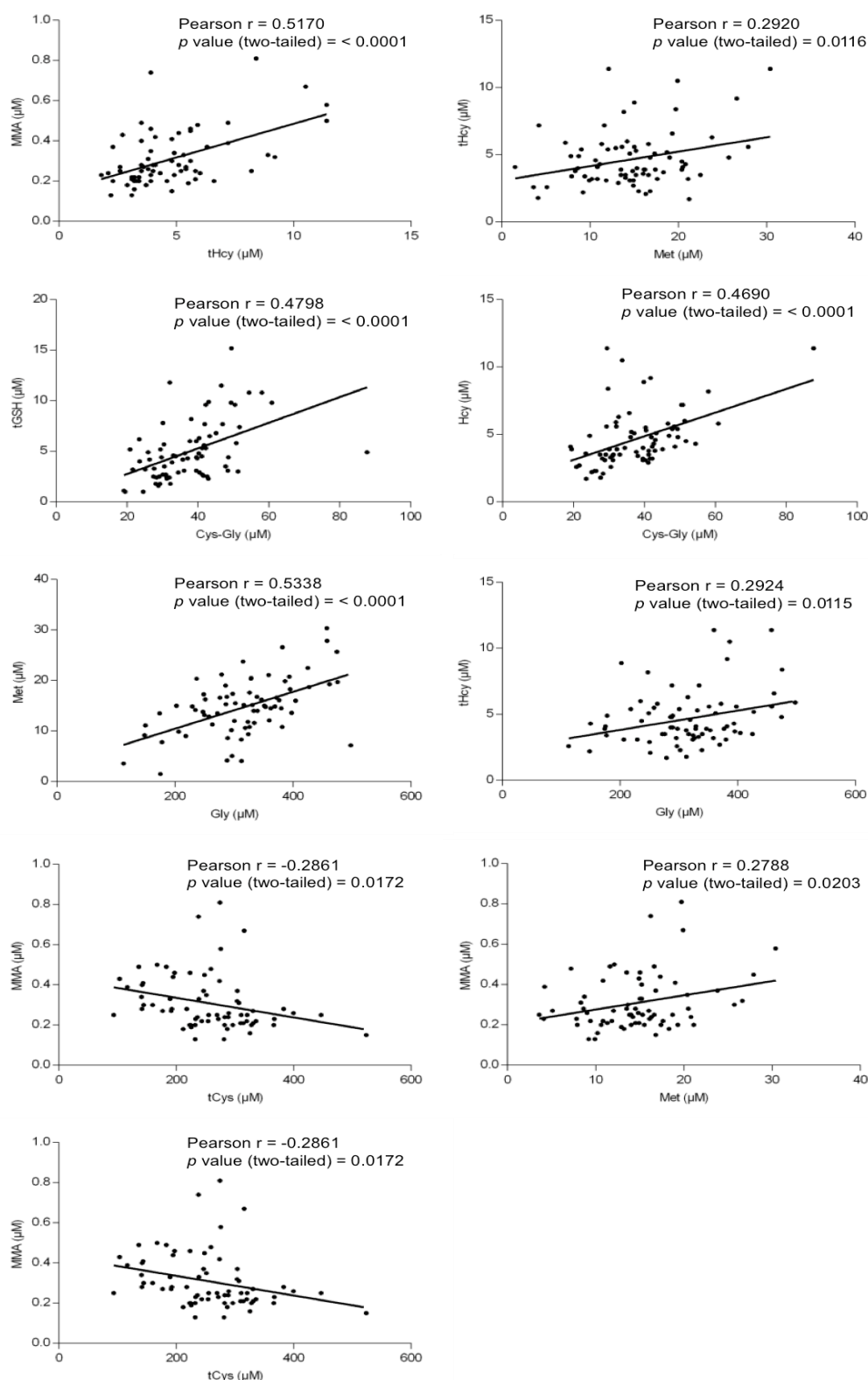
- a) excessiva remetilação da Hcy a Met, conceito que seria convincente dado que, em ambos os grupos de doentes, as dietas são suplementadas com VitB<sub>12</sub>. No presente estudo esta hipótese não parece plausível face aos resultados

encontrados: os teores de Met plasmática, nos grupos estudados, não são superiores ao limite máximo do valor de referência (ver figura V.1.) e detectou-se uma percentagem significativa de amostras com possível deficiência em VitB<sub>12</sub>, o que pode ser atribuído a incumprimento da dieta prescrita, nomeadamente no que se refere à suplementação em vitaminas ser insuficiente devido à restrição em proteína natural na dieta a que os doentes estão submetidos. A correlação significativa entre a tHcy e a Met, no grupo de amostras PKU (figura V.3.) e no da MSUD (figura V.4), suportam a hipótese do teor de tHcy ser modulado pelo aporte de Met, tal como já referido noutros estudos<sup>[90]</sup>.

- a) 6      b) aceleração da via da trans-sulfuração por suplementação da dieta em VitB, por activação das duas primeiras enzimas desta via metabólica as quais são fosfato de piridoxal dependentes<sup>[71; 90]</sup>. De facto, na maioria das amostras, em ambos os grupos, os valores plasmáticos de tCys estão acima do limite superior do valor de referência. Encontrou-se uma correlação negativa significativa ( $p = 0,0172$ ) entre a tCys e o MMA nas amostras PKU, o que apoia a hipótese da diminuição da capacidade da via da remetilação na presença de défice de VitB<sub>12</sub> e, conseqüentemente, aumento da capacidade de metabolização da via da trans-sulfuração e da síntese de cisteína.
- c) mecanismos de retrocontrolo que assegurem a manutenção de níveis adequados de GSH, através de uma maior biodisponibilidade da cisteína para a síntese do GSH<sup>[89]</sup>.

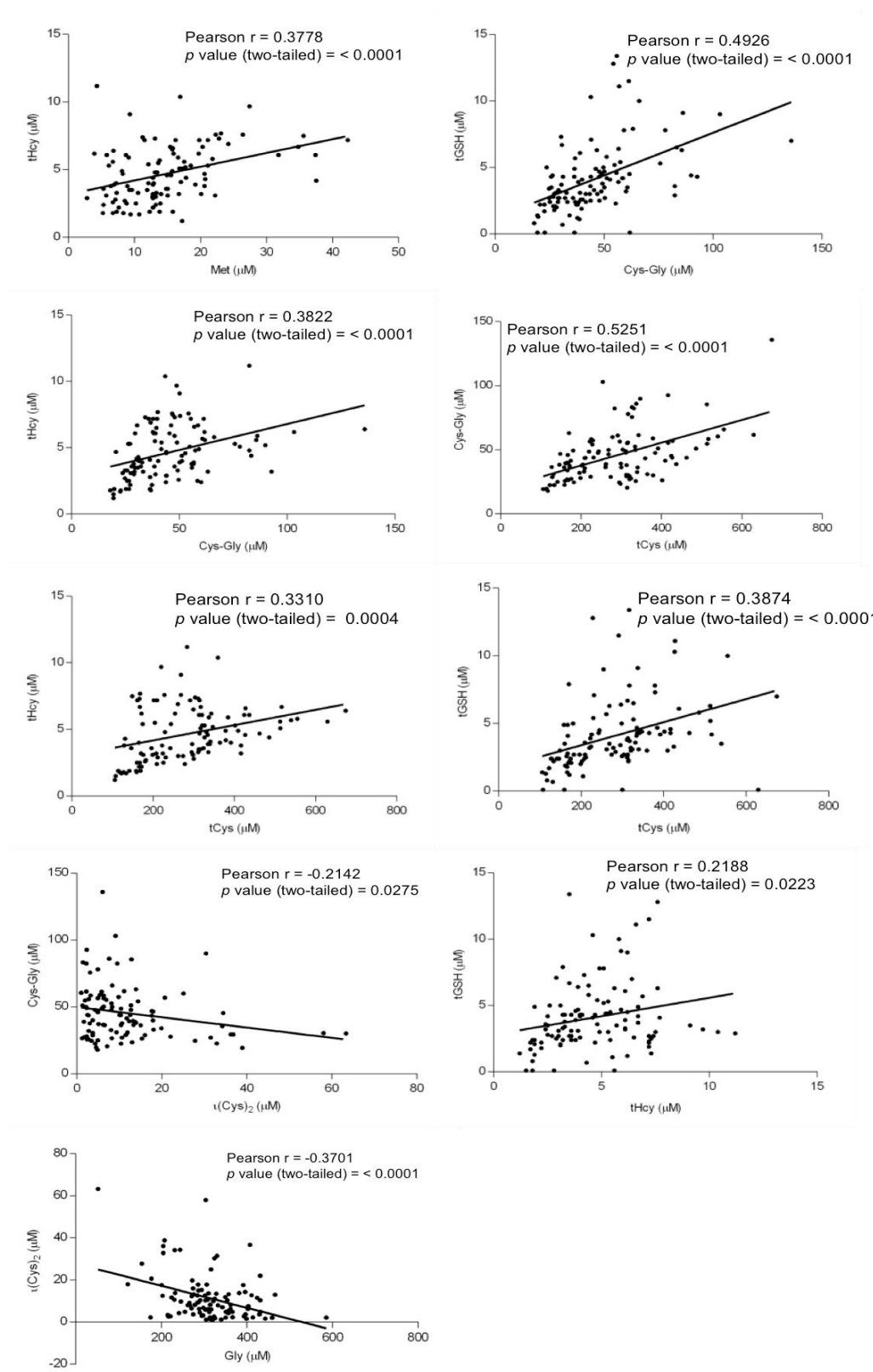
Curiosamente, encontrou-se, em ambos os grupos de amostras, uma correlação fortemente significativa ( $p < 0.001$ ) entre a Cys-Gly e o GSH e a

Cys-Gly e a tHcy. Todavia, unicamente no grupo de amostras MSUD se encontrou uma correlação positiva fortemente significativa ( $p < 0.001$ ) entre os pares: tCys e Cys-Gly; tCys e tHcy e tCys e tGSH e ainda entre o par GSH e tHcy ( $p = 0.0223$ ). Dados que mostram a existência de uma correlação entre os diversos determinantes, do denominado ciclo do glutatono, envolvidos na síntese do GSH (ver figura V.5).

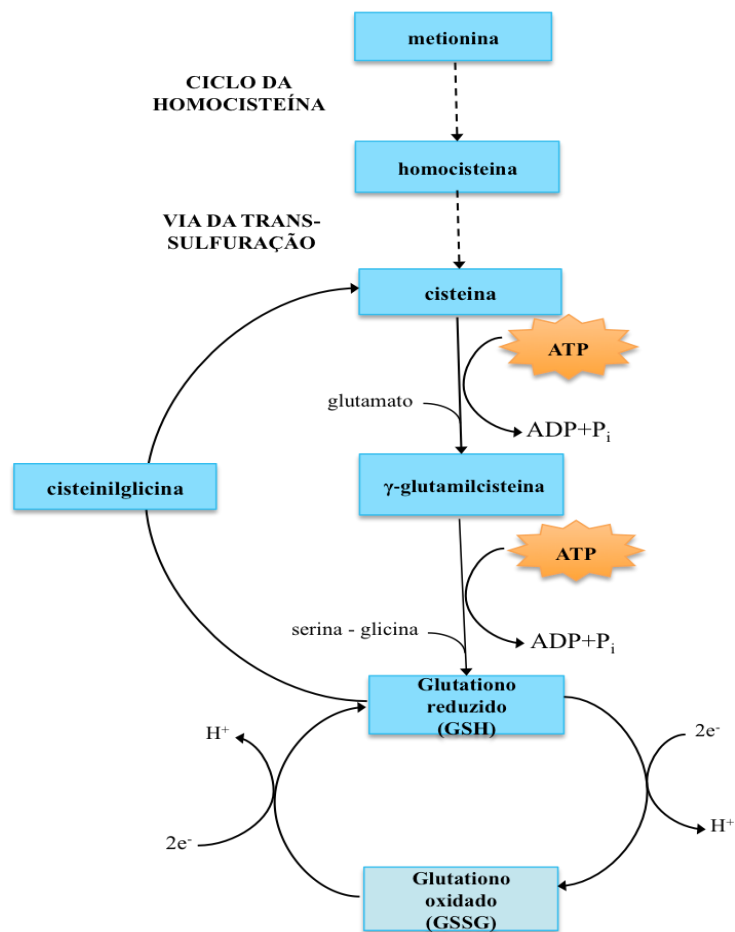


**Figura V.3.** Correlações entre os metabolitos analisados nas amostras de PKU.





**Figura V.4.** Correlações entre os metabolitos analisados nas amostras de MSUD.



**Figura V.5** Via metabólica de síntese do glutatióno.

- a) É importante compreender-se a razão da presença de níveis elevados de cisteína, o precursor do GSH. A cisteína tem citotoxicidade e a sua concentração deve ser mantida abaixo do limiar de toxicidade. Todavia, os níveis de tCys devem ser mantidos de forma que seja assegurada a síntese proteica e a síntese de moléculas crucias no processo metabólico como: o GSH, a taurina, a coenzima A e os sulfatos inorgânicos<sup>[94]</sup>. A *pool* intracelular de cisteína é alimentada pela dieta e pela síntese *de novo* através da via de trans-sulfuração da metabolização da Hcy.

O fígado é o órgão que se encarrega da produção maioritária de GSH e da sua exportação, sendo o GSH usado como o transportador de cisteína inter-órgãos e o responsável pela manutenção dos níveis extra- e intra - celulares de cisteína dentro dos limites aceitáveis<sup>[89; 94]</sup>. Uma desregulação do ciclo do GSH, nomeadamente nos passos que levam à síntese de  $\gamma$ -glutamylcisteína e posteriormente à formação do glutathione, teoricamente levaria a uma acumulação de cisteína<sup>[94]</sup>. Não é muito plausível esta explicação porque o teor plasmático de Cys-Gly, o produto da metabolização do GSH, se encontra também elevado. Os dados mostram que há uma correlação entre os diversos metabolitos (Cys-Gly; tCys; tGSH) do ciclo do glutathione e que o teor de tCys plasmática parece estar directamente relacionado com o teor de GSH plasmático.

Os nossos resultados têm que ser interpretados com alguma cautela dado que é preciso ter em consideração que os valores de cisteína total referem-se à soma das frações livres e ligadas, o que não nos permite tirar ilações quanto à influência da fração livre na síntese do GSH. É ainda de realçar que o teor de  $\text{l(Cys)}_2$  (cistina livre, ou seja, a forma oxidada da cisteína), na maioria das amostras – 86,4% das amostras PKU e 87,2% das amostras MSUD – apresenta valores inferiores ao do limite mínimo do valor de referência. Isto pode indicar que o teor de cistina na dieta é inferior ao desejado ou que não há um equilíbrio entre a forma oxidada  $\text{(Cys)}_2$  (cistina) e a forma reduzida tCys, o que pode ser devido a alteração intracelular do *status de redox* celular. Explicação que se baseia no facto de uma percentagem significativa de amostras ter revelado teores de GSH abaixo do valor mínimo de referência. É bem conhecido que teores baixos de GSH estão associados a má nutrição proteica, stresse oxidante e diversas condições patológicas<sup>[95]</sup>.

Neste aspecto, os nossos resultados não são passíveis de ser comparados, uma vez que os estudos sobre a possível presença de stresse oxidante nas patologias por nós estudadas, avaliam parâmetros como a reactividade oxidante total e a actividade das enzimas anti – oxidantes, como a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido desmutase, como no estudos realizados por *Sitiori et al*<sup>[26]</sup> e por *Barschak et al*<sup>[39]</sup>, parâmetros estes não analisados neste estudo.

Na tabela V.3 mostram-se os valores médios, mínimo e máximo, dos metabolitos patognomónicos da PKU e da MSUD determinados nas amostras analisadas.

**Tabela V.3.** Metabolitos marcadores da PKU e da MSUD: média, valor mínimo e valor máximo.

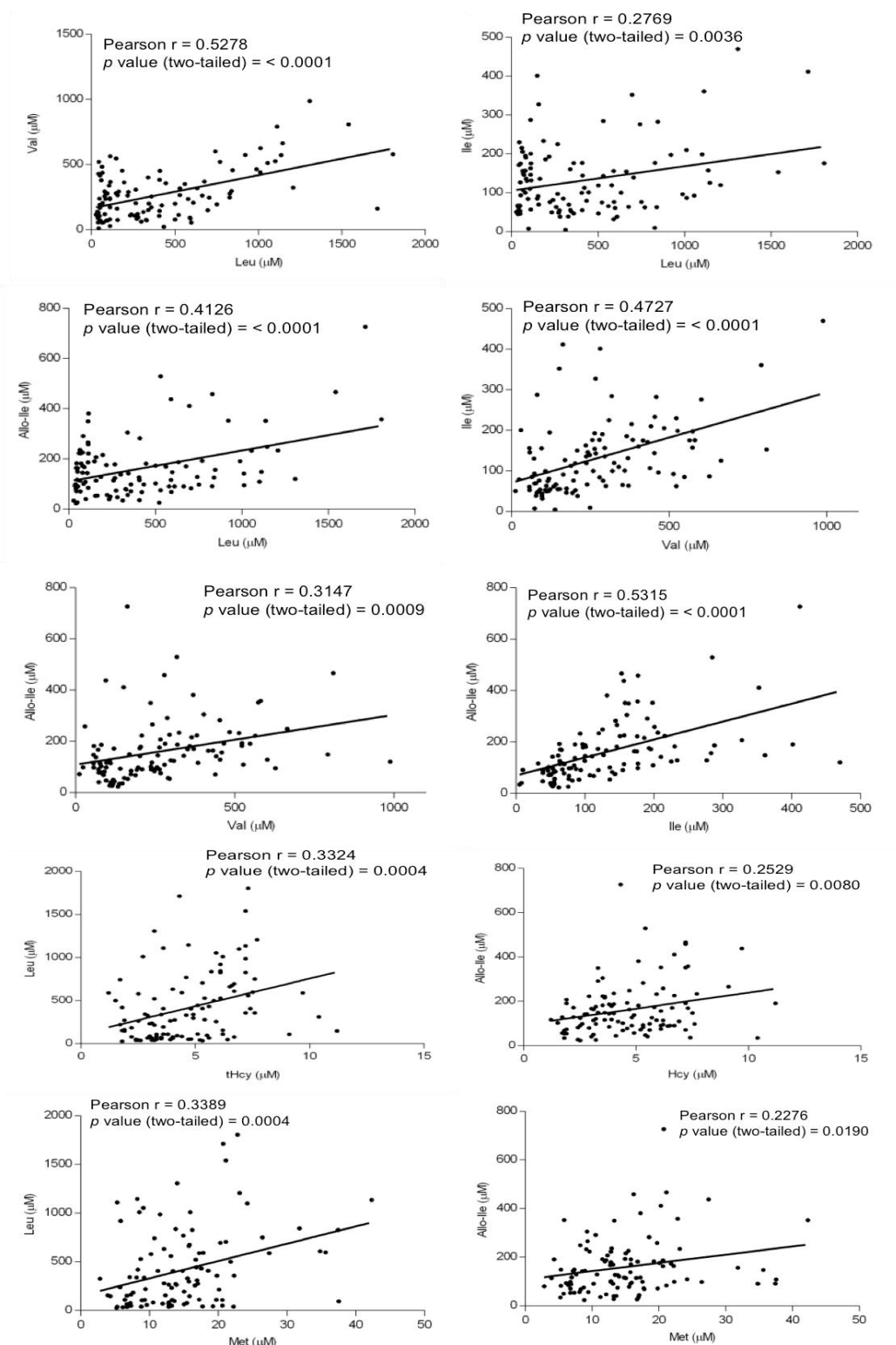
<b>Amostras</b>	<b>Phe</b> ( $\mu$ M)	<b>Leu</b> ( $\mu$ M)	<b>Ile</b> ( $\mu$ M)	<b>Val</b> ( $\mu$ M)	<b>Ala-Ile</b> ( $\mu$ M)
<b>PKU</b> (n=74)	410,7 (20,9 - 1772,2)	-	-	-	-
<b>MSUD</b> (n=109)	-	413,4 (34,6 - 1806,5)	131,7 (4,9 - 470,2)	270,8 (11,5 - 988,0)	162,3 (23,6 - 726,8)
v.r. <sup>a</sup> (min-máx.)	41,8 – 110,2	46,5 – 109,0	26,7 – 52,6	80,2 – 245,7	n.d.

úmero de amostras; v-r. - valor de referência; n.d. – não detectado

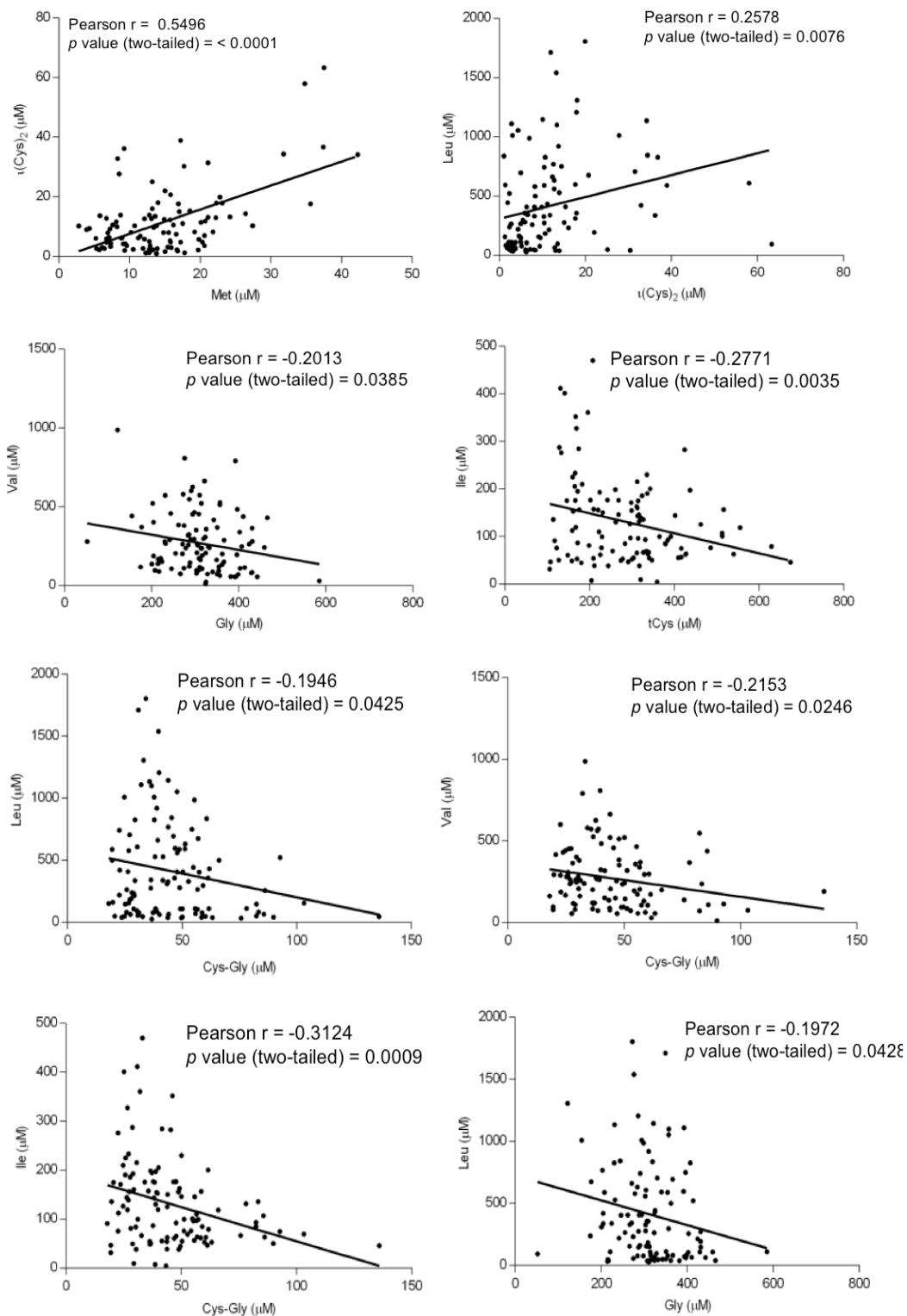
Na figura V.6. encontram-se representadas as correlações encontradas entre estes biomarcadores e os restantes biomarcadores analisados. Nas amostras PKU não se encontrou qualquer correlação entre os níveis de Phe e os restantes metabolitos determinados. Esta falta de correlação pode ser devido ao facto dos valores de Phe estarem, na maioria dos casos, próximo do limite máximo do valor de referência, nas amostras estudadas. Numa parte significativa das amostras

MSUD, os valores dos aminoácidos ramificados encontravam-se acima dos valores máximos de referência respectivos. As descompensações nestes doentes são muito mais frequentes do que nos doentes PKU e com consequências muito mais graves. Nas amostras MSUD, como seria expectável, encontrou-se correlações significativas entre os marcadores patognomónicos da MSUD (ver figura V.6.), ou seja, entre os pares: Leu-Val; Leu-Ile; Leu-AlloIle; Val-Ile; Val-AlloIle e Ile-AlloIle. Encontrou-se ainda uma correlação positiva significativa entre os pares: Leu-Hcy; Allo-Ile-Hcy; Met-Leu; Met-AlloIle; Met – (Cys)<sub>2</sub> e a Leu-(Cys)<sub>2</sub>.

O aumento dos aminoácidos ramificados, seja qual for a causa: incumprimento da dieta ou aumento de catabolismo proteico por descompensação; parece ser acompanhada de acumulação de Met, Hcy e (Cys)<sub>2</sub>. Este incremento pode ser, em parte, devido ao aumento de aporte proteico ou à presença de deficiência em co-factores, nomeadamente VitB<sub>12</sub> e VitB<sub>6</sub> que afectam quer a via da remetilação da Hcy quer a via da trans-sulfuração deste aminoácido. Curiosamente detectou-se uma correlação negativa significativa entre os pares: Leu - Cys-Gly; Val – Cys-Gly; Ile – Cys-Gly e ainda entre os pares Leu-Gly; Val-Gly; l(Cys)<sub>2</sub> - Gly. Teores elevados de Leu, Val, Ile parece, assim, estarem relacionadas com valores baixos de Cys-Gly e Gly, dois dos determinantes da síntese e da regeneração do GSH.



**Figura V.6.** Correlações entre os metabolitos analisados e os biomarcadores na amostra de MSUD.



**Figura V.6** (continuação)

Em resumo, a análise global dos parâmetros avaliados mostram que há alterações significativas em grande parte dos tióis avaliados e seus determinantes afectando, ao que parece, a síntese de GSH. Os dados encontrados levantam hipóteses que terão que ser reavaliadas em estudos alargados e desenhados para o efeito. Em síntese, o papel dos biomarcadores tHcy e MMA, como marcadores predictores de deficiência em VitB<sub>12</sub> deve ser tida em conta em avaliações futuras destes grupos de doentes. Devem ser avaliadas as diferentes formas de GSH e Cys, as formas oxidadas e as reduzidas, dado que a avaliação da soma de ambas revelou alterações nas amostras estudadas. Será ainda necessário alargar a avaliação dos aminoácidos plasmáticos em função do aporte proteico, a fim de se tentar entender as repercussões entre os metabolitos precursores de outros biomarcadores relevantes no processos celulares, tal como o glutathione.



## **CAPÍTULO VI**

*Comentários finais e Perspectiva futura*



## 1. COMENTÁRIOS FINAIS

A avaliação global dos resultados revelou diversos desvios quando comparados com os valores de referência estabelecidos para os metabolitos estudados. Quer os doentes PKU quer os doentes MSUD são submetidos a um régimen dietético semelhante, excepto no que respeita a restrição nos aminoácidos essenciais que é condicionada pela patologia.

É sabido que os valores plasmáticos de VitB<sub>12</sub> próximos do limite inferior do valor de referência não permitem avaliar correctamente a possibilidade da presença de um estado embrionário de deficiência em VitB<sub>12</sub>. Uma anemia nem sempre está presente e a deficiência em B<sub>12</sub> (cobalamina) funcional (holotranscobalamina ou VitB<sub>12</sub> activa) pode ocorrer na presença de concentrações de VitB<sub>12</sub> consideradas normais - baixas<sup>[96]</sup>.

A procura de outros biomarcadores mais sensíveis tem sido objecto de diversos estudos<sup>[97]</sup>. A homocisteína (Hcy) e o ácido metilmalónico (MMA) têm sido consideradas biomarcadores preditores da deficiência em VitB<sub>12</sub>. Todavia, o MMA parece ser o metabolito de eleição dado que a sua metabolização depende directamente do teor de cobalamina intracelular a qual participa na formação da adenosilcobalamina, o co-factor da mutase que irá intervir na metabolização do MMA. O teor de Hcy depende do balanço existente entre VitB<sub>12</sub>, ácido fólico e VitB<sub>6</sub>, dado que é metabolito charneira entre a via da remetilação e a via da trans-sulfuração envolvidas na metabolização da Hcy. A deficiência em VitB<sub>12</sub>, alterando a metabolização da Met a Hcy e desta a Cys, tem inúmeras consequências interferindo com diversos processos celulares, incluindo a síntese de GSH. A síntese de Cys pela via da trans-sulfuração da Hcy parece ser um importante contribuinte na formação da GSH.

Nas amostras analisadas encontrámos, na população de amostras PKU, uma percentagem de amostras relativamente elevada (28,4%) com um teor de MMA plasmático superior ao limite de referência. Infelizmente, não nos foi possível determinar este parâmetro na população de amostras MSUD, dado o volume de amostra ser insuficiente. Tudo indica que este biomarcador deve ser tido em linha de conta em estudos futuros.

Curiosamente, o teor de (Cys)<sub>2</sub>, em cerca de 85% das amostras analisadas de ambas as populações, estava a baixo do limite inferior de referência. Este dado pode indicar que a dieta não está a fornecer a quantidade necessária deste aminoácido ou que nas células estão presentes condições que levam à redução da (Cys)<sub>2</sub> a Cys. Esta hipótese, talvez seja plausível, dado os teores de Cys estarem elevados na maioria das amostras analisadas. Há evidências da cisteína ser utilizada na síntese proteica com uma prioridade mais elevada do que na síntese do GSH, o que pode justificar o teor elevado de tCys encontrado nas nossas amostras<sup>[98]</sup>.

Outra explicação poderá ser devida à competição com o glutamato para o transporte da (Cys)<sub>2</sub>. A acumulação dos BCKAAs pode induzir aumento do glutamato, através da reacção de transaminação que dá origem aos cetoácidos correspondentes. O teor de glutamato e de glutamina não foram avaliados nestas amostras dado tratarem-se de amostras armazenadas há vários anos. Apesar de devidamente armazenadas, a -20 C, é sabido que a glutamina se pode degradar em glutamato e os resultados não seriam fiáveis. Contudo, são dois aminoácidos que também devem ser tidos em consideração em estudos futuros.

Os valores de tCys, como já referido, encontravam-se aumentados numa grande parte das nossas amostras. É sabido que a disponibilidade da cisteína, o substrato limitante, determina a regulação, a curto prazo, da produção de GSH<sup>[98]</sup>. Os valores de GSH

encontrados na nossa população de amostras não revelam, claramente, esta associação uma vez que se detectou num número significativo de amostras um teor de GSH inferior ao do limite mínimo. Contudo, nas amostras do grupo MSUD encontrou-se uma correlação positiva forte ( $p < 0.0001$ ) entre o tGSH e o tCys. Todavia, é necessário analisar o significado dos resultados encontrados com alguma precaução porque não avaliamos as formas livres, ou seja as formas reduzidas, mas sim a total, isto é, as formas livres e as ligadas. Há evidências da cisteína ser utilizada na síntese proteica com uma prioridade mais elevada do que na síntese do GSH, o que pode justificar o teor elevado de tCys encontrado nas nossas amostras<sup>[99]</sup>. Assim, será da maior importância, em estudos futuros, avaliar-se as formas reduzidas e as oxidadas de forma a se entender a correlação entre elas. Há ainda que ter em conta que o teor de Cys é condicionado pela VitB<sub>6</sub>, dado que a sua forma activa – o fosfato de piridoxal – é o co-factor das duas primeiras enzimas da via da trans-sulfuração da Hcy que leva à formação de Cys. As dietas destes doentes são suplementadas com VitB<sub>6</sub> e como tal pode haver um aumento de fluxo na via da trans-sulfuração.

No que se refere à Met e à Gly, precursores indirecto e directo da GSH, a grande maioria dos valores nas amostras analisadas, nos dois grupos, encontravam-se dentro dos valores de referência. Contudo, na maioria das amostras o teor de Met encontrava-se no limiar do limite mínimo de referência. Foi demonstrado, em alguns estados de doenças, que uma deficiência em Met pode induzir uma deficiente produção de GSH, levando ao aparecimento de um estado de stresse oxidante<sup>[90]</sup>. Em ambos os grupos de amostras detectou-se uma correlação positiva significativa entre a Met e a tHcys mas não se detectou qualquer tipo de correlação entre a Met e o tGSH.

As evidências indicam que um balanço entre os aminoácidos da dieta assim como as vitaminas e minerais tem um efeito importante na homeostasia do GSH. Contribuindo este antioxidante de forma relevante para a função global do sistema antioxidante celular será da maior importância compreender a inter-relação dos metabolitos que directa ou indirectamente intervêm na regulação da síntese do GSH.

## **2. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os dados obtidos, apesar de terem que ser interpretados com alguma precaução dado as amostras não terem sido colhidas de acordo com o protocolo laboratorial estabelecido para a avaliação dos tióis, claramente mostram que a existência de inter-correlações metabólicas entre vitaminas, que actuam como co-factores de diversas enzimas em vias metabólicas cruciais na manutenção de processos metabólicos vitais, e os aminoácidos intervenientes nestas vias metabólicas e de algum modo implicados na síntese do GSH, devem ser exploradas a fim de ser possível melhorar, ou controlar mais eficazmente, a terapia dietética a que os doentes PKU e MSUD estão sujeitos.

Especial atenção deve ser dada às formas oxidadas e reduzidas dos tióis, assim como aos restantes aminoácidos que constituem o tripéptido da GSH, isto é, o ácido glutâmico e respectiva amina, a glutamina, e ainda a serina, precursor da glicina numa reacção folato dependente. O stresse oxidante, quer nos doentes PKU quer nos MSUD, pode ser devido a deficiência em selénio, co-factor da enzima glutathione peroxidase, enzima que com a glutathione reductase (ver figura II.9) assegura o equilíbrio entre a forma oxidada e a reduzida do GSH. Há ainda que considerar o papel do CQ-10 (ubiquinona 10) cuja síntese

endógena parte do ácido 4-hidroxifenilpirúvico produto da transaminação da tirosina. A análise destes biomarcadores deve também ser incluída em estudos futuros.

Assim, estudos futuros devem ser desenhados de modo a ser eleita uma população de doentes PKU e MSUD, em que exista emparelhamento entre idades, sexo e dieta. Será necessário estabelecer um protocolo rigoroso que estabeleça previamente os metabolitos a serem determinados, após ampla discussão entre os bioquímicos, clínicos e nutricionistas, que permita obter, de uma forma viável, as amostras nas mesmas condições, essencialmente no que respeita o tempo de jejum, a preparação pré-analítica das amostras e o armazenamento das mesmas até posterior análise.

Um estudo alargado e controlado, é um desafio, que esperamos que seja possível realizar-se em colaboração com a Unidade de Doenças Metabólicas do Hospital Sta. Maria. Certamente, novos dados surgiram que possam ser transferidos para a clínica, a fim de se aumentar a eficácia da terapia dietética a que estes doentes estão sujeitos.





## **AGRADECIMENTOS**



A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma directa ou indirecta, de várias pessoas e, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

Ao Professor Doutor Manuel Bicho, pela orientação, dedicação e disponibilidade total.

À Professora Doutora Isabel Tavares de Almeida, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Dissertação. Agradeço também a sua disponibilidade, dedicação e orientação nestes dois longos anos que muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais, e a vontade constante de querer fazer melhor. Aprendi muito consigo e estou-lhe grata por isso.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Cristina Ribeiro, pelo carinho e amizade ao longo dos anos e pelo apoio e disponibilidade imediatas com a Tese. Agradeço também à Professora Doutora Paula Leandro pela sua disponibilidade. Sem os vossos conselhos não teria chegado aqui.

Quero ainda agradecer à Dra. Patrícia Janeiro e à Dra. Ana Gaspar por me terem facilitado o acesso às consultas de Pediatria e dado a oportunidade de conhecer mais a fundo as patologias que estudei.

Aos colegas do Centro de Patogénese Molecular – à Cristina Florindo, à Ana Seerão e ao Israel Gonçalves pelo apoio e colaboração prestados no desenvolvimento experimental; ao João Leandro pela ajuda na análise estatística dos resultados. A vossa colaboração foi essencial para a elaboração desta Dissertação. Gostaria ainda de fazer um agradecimento especial ao Rúben Ramos, pela enorme amizade, disponibilidade e dedicação que me deu. Agradeço-lhe a partilha de bons momentos, a ajuda incondicional e a aprendizagem que me facultou ao longo de todos os processos. Foi um prazer ser a tua *padawan*.

Ao meu marido, pela paciência e apoio nas longas ausências e ao meu irmão, simplesmente por ser ele. Agradeço também ao meu primo Paulo por me manter acordada nas horas de maior importância e ao meu tio José por me ensinar que nem todos somos génios mas que todos deveríamos ser sábios.

Por último, aos meus Pais, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa que agora termina, possa de alguma forma retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente me oferecem. A eles, dedico todas as horas de frustração, lágrimas e especialmente alegrias deste trabalho.



## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Laura Vilarinho, Paulo Pinho e Costa, Luísa Diogo, *Programa Nacional de Rastreio Precoce*, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2012).
- [2] Sanderson S., Green A., Preece NA., Burton H. *The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK*. Arch Dis Child (2006); 91- 896-9.
- [3] Fernandes J., Saudubray JM., Berghe G., Walter JH, *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. Forth Edition, (2000): 5-6.
- [4] Van Spronsen FJ, Smit GPA, Erwich JJHM , *Inherited metabolic diseases and pregnancy*. BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology (2205); 112: 2-11.
- [5] Saudubray JM, *Inborn errors of metabolism*, Semin Neonatol (2002); 7 (issue 1).
- [6] Penrose L., Quastel JH., *Metabolic Studies in Phenylketonuria*, Biochem J. (1937); 31(2): 266–274.
- [7] Centerwall SA, Centerwall WR. *The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist*. Pediatrics (2000);105:89-103.
- [8] Blau N., van Spronsen F.J., Levy H.L., *Phenylketonuria*. Lancet (2010); 376: 1417–27.
- [9] Scriver CR. *The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift*. Hum Mutat (2007); 28: 831–45.
- [10] Loeber JG. *Neonatal screening in Europe; the situation in 2004*. J Inherit Metab Dis (2007); 30: 430–38
- [11] Ozalp I, Coskun T, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Tokol S, Köksal G, Ozgüc M, Köse R., *Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future*. Turk J Pediatr (2001); 43: 97–101.
- [12] Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC. *Phenylketonuria and the people of Northern Ireland*. Hum Genet (1997); 100: 189–94.
- [13] Guldborg P, Henriksen KF, Sipila I, Guttler F, de la Chapelle A., *Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland*. J Med Genet (1995); 32: 976–78.
- [14] Borrajo GJ., *Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century*. J Inherit Metab Dis (2007); 30: 466–81.
- [15] Zhan J.Y., Qin Y.F., Zhao ZY., *Neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria in China*. World J Pediatr (2009); 5: 136–39.
- [16] Jiang J., Ma X., Huang X., Pei X., Liu H., Tan Z., Zhu L., *A survey for the incidence of phenylketonuria in Guangdong, China*. Southeast Asian J Trop Med Public Health (2003); 34 Suppl 3:185.
- [17] Pangkanon S., Charoensiriwatana W., Janejai N., Boonwanich W., Chaisomchit S., *Detection of phenylketonuria by the newborn in Southeast Asian*. J Trop Med Public Health 2009; 40: 525–29. screening program in Thailand
- [18] Aoki K., Ohwada M, Kitagawa T., *Long-term follow-up study of patients with phenylketonuria detected by the newborn screening programme in Japan*. J Inherit Metab Dis 2007; 30: 608

- [19] *Phenylketonuria (PKU): screening and management*. NIH Consens Statement. October 16–18, (2000); 17: 1–33.
- [20] Yoshiyuki Okano., Eisensmith RC., *Molecular Basis of Phenotypic Heterogeneity in Phenylketonuria*, N Engl J Med (1991); 324: 1232-1238.
- [21] Armstrong MD., shaw KNF., Robinsosn KS., *Studies of Phenylketonura: II. The excretion of o-Hydroxyphenylacetica acid in Phenylketonuria*, J. Biol. Chem., (1955); 213: 797-804.
- [22] Smith I., Lee P., *The Hyperphenylalaninaemias*. In: Fernandes J, Saudubray, J-M, van den Berghe G, editors. Inborn Metabolic Diseases. 3rd ed. Heidelberg: Springer; (2000); 171-84.
- [23] Kathleen M., Janice R., Sylvia E.S., *Krause's Food & Nutrition Therapy*, 12 Edition (2000); 69.
- [24] Saldanha C., Martins e Silva J., *Aspectos bioquímicos e clínicos da Fenilcetonúria*, Actas Bioq. (2007), 8: 79-87.
- [25] Pietz J., Kreis R., Rupp A., Mayatepek E., Rating D., Boesch C., Bremer HJ., *Large Neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria.*, The Journal of Clinical Investigation, April (1999), Vol. 103., No.8.
- [26] L.R. Sirtoria, C.S. Dutra-Filhoc, D. Fitarellia, A. Sittaa, A. Haesera, A.G. Barschakb, M. Wajnera,c,D.M. Coelhob, S. Llesuyd, A. Belló-Kleine, R. Giugliania, M. Deona, C.R. Vargas, *Oxidative stress in patients with phenylketonuria*, Biochimica et Biophysica Acta 1740 (2005) 68–73.
- [27] Lucock M., Yates Z, Hall K, Leeming R, Rylance G, MacDonald A, Green A., *The impact phenylketonuria on folate metabolism*. Molecular Genetics and Metabolism 76 (2002) 305-2012.
- [28] Flatmark, T., Stevens, R. C., *Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-related mutant forms*. Chem. Rev. (1999), 2137-2160.
- [29] Woo S.L., Lidsky A.S., Guttler F., Chandra T., Robson KJ., *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria*. Nature 1983; 306: 151–55.
- [30] Kappock, T. J., Caradonna J. P., *Pterin-dependent amino acid hydroxylases*. Chem. Rev. (1996), 2659-2756.
- [31] Scriver C.R., Kaufman S., *Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. New York: McGraw-Hill, (2001): 1667–724
- [32] Zschocke J., *Phenylketonuria mutations in Europe.*, Hum Mutat 2003; 21: 345–56.
- [33] Lindner M., *Treatment of phenylketonuria variants: European recommendations*. In: Blau N, ed. *PKU and BH4: advances in phenylketonuria and tetrahydrobiopterin*. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft mbH, 2006: 180–87.
- [34] Hanley W.B., *Adult phenylketonuria.*, Am J Med 2004;117:590-5.
- [35] Menkes J.H., Hurst P.L., Craig J.M., *A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance.*, Pediatrics 1954;14:462-7
- [36] Chuang D.T., Shih V.E., *Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria)*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p1971-2005



- [37] Morton D.H., Strauss K.A, Robinson D.L., Puffenberger E.G., Kelley R.I., *Diagnosis and Treatment of Maple Syrup Urine Disease: A Study of 36 Patients*, Pediatrics (2002); vol.109 No.6 : 999-1008.
- [38] Quental S., Vilarinho L., Martins E., Teles E.L., Rodrigues E., Diogo L., Garcia P., Eusébio F., Gaspar A., Sequeira S., Amorim A., Prata M.J., *Incidence of maple syrup urine disease in Portugal*. Molecular Genetics and Metabolism 100 (2010) 385–387.
- [39] Barchak AG., Marchesan C., Sitta A., Deon M., Giugliani R., Wajner M., Vargas CR., *Maple syrup urine disease in treated patients: Biochemical and oxidative stress profiles*, Clinical Biochemistry 41 (2008) 317-324.
- [40] Frazier D.M., Allgeier C., Homer C., Marriage B.M., BethOgata , Rohr F., Splett P.L., Stembridge A., Singh R.H., *Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: An evidence- and consensus-based approach.*, Molecular Genetics and Metabolism 112 (2014) 210–217.
- [41] Elsas II L.J., Acosta P.B., *Nutritional support of inherited metabolic disease. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. Modern Nutrition in Health and Disease. 9th ed.* Baltimore: Williams & Willkins; (1999). p1003-56.
- [42] Berry G.T., Heidenreich R., Kaplan P., Levine F., Mazur A., Palmieri M.J., Yudkoff M., Segal S. *Branched chain amino acid free parental nutrition in the treatment of acute metabolic decompensation in patients with maple syrup urine disease.*, N Engl J Med. (1991);324:175-179.
- [43] Sgaravatti A.M., Rosa R.B., Schuck P.F., Ribeiro C.A., Wannmacher C.M., Wyse A.T., Dutra-Filho C.S., Wajner M., *Inhibition of brain energy metabolism by the alpha keto acids accumulating in maple syrup urine disease*. Biochim Bio-phys Acta 2003;1639:232-8.
- [44] J.L. Chuang, R.M. Wynn, C.C. Moss, J.L. Song, J. Li, N. Awad, H. Mandel, D.T. Chuang, *Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 17792–17800.
- [45] Lynch C.L., Halle B., Fujii H., Vary T.C., Wallin R., Damuni Z., Hutson S.M., *Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR.*, American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism (2003) Vol. 285 no. 4.
- [46] Rocha J.C., Martins E., Cabral A., Almeida M.F., *Consenso para o tratamento nutricional da leucínose.*, Acta Pediátrica Portuguesa 2007;38(3):120-8.
- [47] Cabral A., Portela R., Tasso T., Eusébio F., Tavares de Almeida I., Silveira C., *Doenças dos aminoácidos de cadeia ramificada*. Acta Med Port 1998;11:659-65.
- [48] Henneke M, Flaschker N, Helbling C, Muller M, Schadewaldt P, Gartner J, Wendel U., *Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease*. Hum Mutat 2003;22:417.
- [49] Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM., *Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism*. J Nutr (2006);136:S243-9.
- [50] K. Strauss, E. Puffenberger, D. Morton, *Maple syrup urine disease*, in: R. Pagon, M. Adam, T. Bird, et al., (Eds.), *GeneReviews*, University of Washington, Seattle, University of Washington, Seattle, WA, (2006): 1993–2013.
- [51] Rouvray C., Desport JC., Boutet A., Plouvier L., Fayemendy P., Labarthe F., Fort M., *La leucínose: définition, formes cliniques, diagnostic, prise en charge thérapeutique et diététique*,

- [52] Nellis, M.M., Kasinski, A., Carlson, M., Allen, R., Schaefer, A.M., Schwartz, E.M., Danner, D.J., *Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression*. Mol. Genet. Metab. (2003);80, 189–195.
- [53] Korein J, Sansaricq, Kalmijin M., *Maple Syrup urine Disease: clinical, EEG, and plasma aminoacid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity*. Int J Neurosci (1994);79:21-45.
- [54] Chuang, D.T., Chuang, J.L., Wynn, R.M., *Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism*. J. Nutr.(2006); 136, 243S–249S.
- [55] Machius, M., Wynn, R.M., Chuang, J.L., Li, J., Kluger, R., Yu, D., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Chuang, D.T., *A versatile conformational switch regulates reactivity in human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase*. Structure (2006);14, 287–298.
- [56] Rocha J.C., Vilarinho L., Cabral A., Osório R.V., Almeida M.F., *Consenso para o tratamento nutricional de fenilcetonúria*; Acta Pediatr Port (2007);38(1):44-54
- [57] MacDonald A., Rocha J.C., van Rijn M., Feillet F., *Nutrition in Phenylketonuria.*, Molecular Genetics and Metabolism 104(2011) S10-S18
- [58] MacLeod EL., Ney D.M., *Nutritional Management of Phenylketonuria.*, Ann Nestlé (Engl) (2010);68:58-69
- [59] Przyrembel H, Bremer HJ., *Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria.*, Eur J Pediatr (2000);159 Suppl 2:S129-35.
- [60] Agostoni C, Verduci E, Massetto N, Radaelli G, Riva E, Giovannini M., *Plasma long-chain polyunsaturated fatty acids and neurodevelopment through the first 12 months of life in phenylketonuria.*, Dev Med Child Neurol (2003);45:257.
- [61] Hendriksz C.J., Walter J.H., *Update on phenylketonuria*. Current Paediatrics 2004;14:400-6.
- [62] *Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria*. Arch Dis Child (1993);68:426-7.
- [63] Monch E., Herrmann M.E., Brosicke H., Schoffer A., Keller M., *Utilisation of amino acid mixtures in adolescents with phenylketonuria*. Eur J Pediatr (1996);155 Suppl 1:S115-20.
- [64] MacDonald A., Lilburn M., Davies P., Evans S., Daly A., Hall S.K., Hendriksz C., Chakrapani A., Lee P., *‘Ready to drink’ protein substitute is easier is for people with phenylketonuria*. J Inherit Metab Dis (2006);29:526-31.
- [65] Muntau A.C., Roschinger W., Habich M., Demmelmair H., Hoffman B., Sommerhoff C.P., Rocher A., *Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria.*, N Engl J Med. 2002 Dec 26;347(26):2122-32.
- [67] *National institutes of health (NIH) to host a consensus development conference on screening and management for phenylketonuria (PKU)*. Pediatr Nurs 2000; 26: 539
- [68] Abadie .V, Berthelot J., Feillet F., Maurin N., Mercier A., Ogier de Baulny H., de Parscau L., *Management of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia: the French guidelines*. Arch Pediatr 2005;12:594-601.
- [69] Hanley W.B., Feigenbaum A.S., Clarke J.T., Schoonheydt W.E., Austin V.J., *Vitamin B12 deficiency in adolescents and young adults with phenylketonuria.*, Eur J Pediatr 1996;155 Suppl

1:S145-7.

- [70] Robinson M., White F.J., Cleary M.A., Wraith E., Lam W.K., Walter J.H., *Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet.*, J Pediatr 2000;136:545-7.
- [71] Hvas A.M., Nexø E., Nielsen J.B., *Vitamin B12 and vitamin B6 supplementation is needed among adults with phenylketonuria (PKU).*, J Inher Metab Dis 2006;29:47-53.
- [72] Walter J.H., *Vitamin B12 deficiency and phenylketonuria*, Molecular Genetics and Metabolism 104 (2011) s52-54
- [73] Colomé C., Artuch R., Lambruschini N., Cambra F.J., Campistol J., Vilaseca M., *Is there a relationship between plasma phenylalanine and cholesterol in phenylketonuric patients under dietary treatment?*, Clin Biochem (2001);34:373-6.
- [74] Acosta P.B., *Nutrition studies in treated infants and children with phenylketonuria: vitamins, minerals, trace elements.*, Eur J Pediatr (1996);155 Suppl 1:S136-9.
- [75] Dobbelaere D., Michaud L., Debrabander A., Vanderbecken S., Gottrand F., Turck D., Farriaux J.P., *Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria.* J Inher Metab Dis (2003);26:1-11.
- [76] Nagano M., Suita S., Yamanouchi T., *The validity of bioelectrical impedance phase angle for nutritional assessment in children.* J Pediatr Surg (2000);35:1035-9.
- [77] Wendel U., Ogier de Baulny H., *Branched-chain organic acidurias/acidemias.* In: Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases. 4th ed.* Heidelberg: Springer; (2006). p245-62.
- [78] Thompson S., *Protocol for the use of MSUD Maxamaid in the Dietary Management of Maple Syrup Urine Disease.* The Children's Hospital at Westmead Sydney (2003).
- [79] Synderman S.E. *Treatment outcome of maple syrup urine disease.* Acta Paediatr Jpn (1988);30:417-24
- [80] Hilliges C, Awiszus D, Wendel U., *Intellectual performance of children with maple syrup urine disease.* Eur J Pediatr (1993);152:144-7.
- [81] Hoffmann B, Helbling C, Schadewaldt P, Wendel U., *Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD.* Pediatr Res (2006);59:17-20.
- [82] Juvet P., Jugie M., Rabier D., Desgres J., Hubert P., Saudubray J.M., Man N.K., *Combined nutritional support and continuous extracorporeal removal therapy in the severe acute phase of maple syrup urine disease.* Intensive Care Med (2001);27:1798-806.
- [83] Juvet P., Poggi F., Rabier D., Michel J.L., Hubert P., Sposito M., Saudubray J.M., Man N.K., *Continuous venovenous haemodiafiltration in the acute phase of neonatal maple syrup urine disease.* J Inher Metab Dis (1997);20:463-72.
- [84] Juvet P., Poggi F., Saudubray J.M., *Continuous venovenous haemofiltration in the acute treatment of inborn errors of metabolism.* Pediatr Nephrol (1995);9:127.
- [85] Schaefer F., Straube E., Oh J., Mehls O., Mayatepek E., *Dialysis in neonates with inborn errors of metabolism.* Nephrol Dial Transplant (1999);14:910-8.
- [86] Puliyanda D.P., Harmon W.E., Peterschmitt M.J., Irons M., Somers M.J., *Utility of hemodialysis in*

- maple syrup urine disease.*, *Pediatr Nephrol* (2002);17:239-42.
- [87] Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, Araujo PR, Pires RF, LulhierFL, et al. *Reduction of large neutral amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises.* *J Inher Metab Dis* (2000);23:505-12.
- [88] Daskalakis I, Luccock MD, Anderson A, Wild J, Schorah CJ, Levene MI., *Determination of plasma total homocysteine and cysteine using HPLC with fluorescence detection and an ammonium 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulphonate (SBD-F) derivatization protocol optimized for antioxidant concentration, derivatization reagent concentration, temperature and matrix pH,* *Biomedical Chromatography* (1996); 10(5):205-12.
- [89] Guoyao Wu, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton, Nancy D. Turner, *Gluthathione Metabolism and its implications for Health,* *J Nutr.* (2004);134(3):489-92.
- [90] C. Colomé, R. Artuch, C. sierra, N. Brandi, N. Lambruschini, J. Campistol, M.A. Vilaseca, *Plasma Thiols and their determinants in phenylketonuria,* *European Journal of Clinical Nutrition* (2003) 57, 964-968.
- [91] A.T. Barshhak, C. Marchesan, A. Sitta, M. Deon, R. Giugliani, M. Wajner, C.R. Vargas, *Maple syrup urine Disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles,* *Clinical Biochemistry* 41(2008) 317-324.
- [92] I.Vugteveen, M. Hoeksma, AL. B. Monsen, M. R. Fokkema, DJ. Reijngoud, M. van Rijn, F. J. van Spronsen, *Serum vitamin B12 concentrations within reference values do not exclude functional vitamin B12 deficiency in PKU patients of various ages.,* *Molecular Genetics and Metabolism* 102 (2011) 13–17.
- [93] M. Huemer, M. Födinger, O. Bodamer, A. Mühl, M. Herle, C. Weigmann, H. Ulmer, S. Stöckler-Ipsiroglu, D. Möslinger, *Total homocysteine, B-vitamins and genetic polymorphisms in patients with classical phenylketonuria,* *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 46–51.
- [94] Stipanuk M.H., Ueki I., *Dealing with methionine / homocysteine sulfur: cysteine metabolism totaurine an inorganic sulfur,* *J Inher Metab Dis.* 2001 Feb; 34(1): 17-32
- [95] Ribas G.S., Sitta A., Wajner M., Vargas C.R., *Oxidative stress in PKU: what is the evidence?,* *Cell Mol Neurobiol.* 2011 Jul;31(5):653-62
- [96] E. Nexø, E. Hoffman-Lucke, *Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility,* *Am J Clin Nutr.* (2011);94(1):359S-365S.
- [97] M. der Velden, M var der Ham, J.J. Jans, G. Visser, P. Van Hasselt, H. Prinses, Nanda Verhoeven-Duif, *Suitability of methylmalonic acid and total homocysteine analysis in dried bloodspots,* *Analytica Chimica Acta* 853 (2015), 435-441.
- [98] M.H. Stipanuk, J.E. Dominy Jr., Jeong-In Lee, R.M. Coloso, *Mammalian Cysteine Metabolism: New Insights into Regulation of Cysteine Metabolism,* *J Nutr.* (2006);136(6 Suppl):1652S-1659S
- [99] Courtney\_martin G., Rafii M., Wykes L.J., Ball R.O., Pencharz P.B., *Methionine-adequate Cysteine-free diet does not limit erythrocyte glutathione synthesis in young adult men,* *J Nutr* (2008);138(11): 2172-78

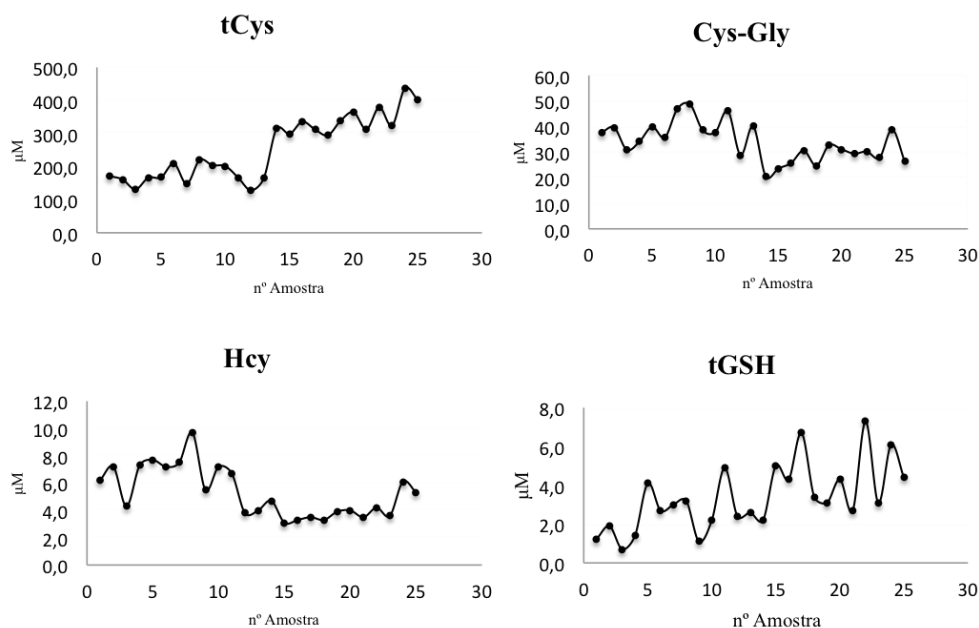
## **ANEXOS**

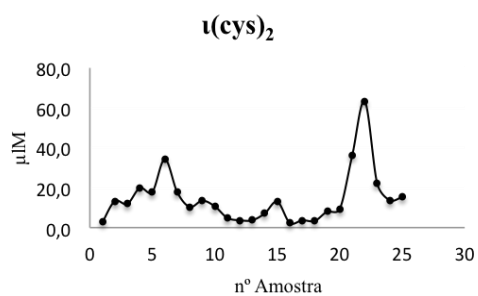
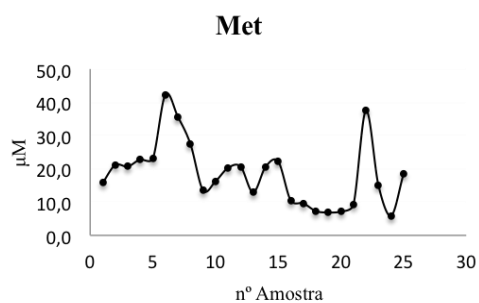
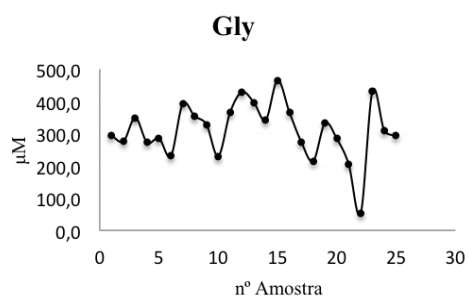
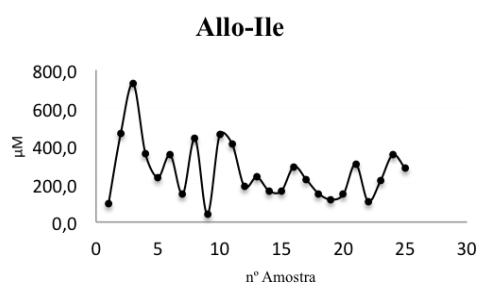
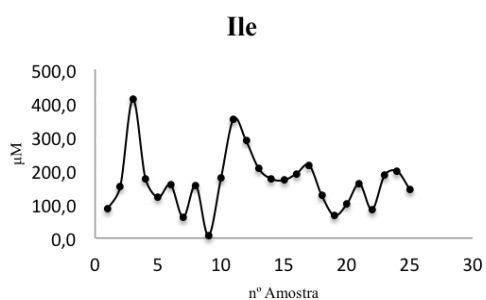
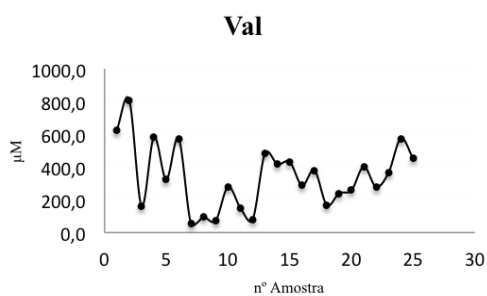
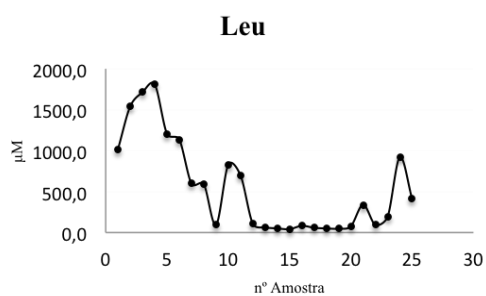


## MSUD – Doente 1

Metabolitos (µM)											
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	i(cys) <sub>2</sub>
1	171,2	37,7	6,2	1,2	1011,4	627,1	86,8	95,9	294,2	15,9	3,0
2	160,9	39,6	7,2	1,9	1540,2	809,1	153,0	467,1	275,9	21,1	13,2
3	131,0	30,9	4,3	0,7	1712,8	162,5	411,9	726,8	349,1	20,7	11,9
4	166,2	34,1	7,3	1,4	1806,5	581,1	176,2	358,0	272,3	22,8	19,9
5	167,5	39,9	7,7	4,1	1206,7	324,8	119,9	234,0	285,4	23,1	17,9
6	209,2	35,7	7,2	2,7	1136,6	573,5	157,8	352,4	230,7	42,3	34,2
7	148,0	46,9	7,5	3,0	597,5	55,9	61,1	147,4	391,5	35,6	17,6
8	219,7	48,7	9,7	3,2	589,5	94,2	156,2	438,5	354,2	27,4	10,4
9	204,0	38,6	5,5	1,1	96,8	72,7	7,5	41,2	328,3	13,6	13,5
10	201,5	37,8	7,2	2,2	828,2	278,4	176,8	459,2	230,1	16,2	10,6
11	166,9	46,1	6,7	4,9	696,6	150,9	352,3	411,9	365,9	20,3	4,9
12	128,3	28,8	3,8	2,4	108,9	80,2	287,8	187,3	428,9	20,6	3,7
13	164,5	40,1	4,0	2,6	63,3	483,9	205,8	236,2	396,6	12,9	3,7
14	314,6	20,5	4,7	2,2	50,3	416,6	175,2	163,6	342,5	20,6	7,1
15	298,1	23,6	3,1	5,0	41,4	430,9	171,6	164,3	465,4	22,2	13,0
16	335,7	25,7	3,3	4,3	81,9	287,6	190,5	291,6	366,4	10,5	2,4
17	312,1	30,6	3,5	6,7	58,1	380,3	215,8	223,4	274,4	9,6	3,7
18	294,8	24,7	3,3	3,4	49,9	168,4	126,7	149,6	214,7	7,3	3,4
19	339,2	32,7	3,9	3,1	47,0	239,3	67,0	117,9	332,2	6,9	8,0
20	364,5	31,1	4,0	4,3	78,0	258,0	100,1	145,9	284,0	7,2	9,3
21	312,6	29,4	3,5	2,7	338,1	402,2	160,6	305,4	204,4	9,2	36,2
22	379,1	30,2	4,2	7,3	93,7	278,8	84,2	109,3	51,9	37,5	63,3
23	323,7	27,8	3,6	3,1	194,5	364,6	185,9	216,1	431,1	15,0	22,0
24	436,5	38,9	6,1	6,1	920,0	574,0	197,8	353,3	309,9	5,8	13,7
25	401,5	26,3	5,3	4,4	409,6	452,5	144,4	282,9	293,9	18,5	15,3
média	254,1	33,9	5,3	3,4	550,3	341,9	166,9	267,2	311,0	18,5	14,5
v.r. <sup>a</sup>	Min	140,0	32,0	4,0	5,0	46,5	80,2	26,7	227,8	8,7	20,0
	Máx	198,0	34,0	7,0	8,0	109,0	245,7	52,6	n.d.	514,2	40,9
											60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



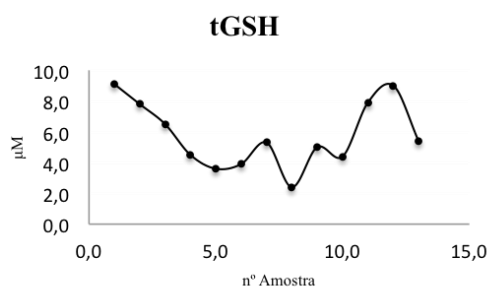
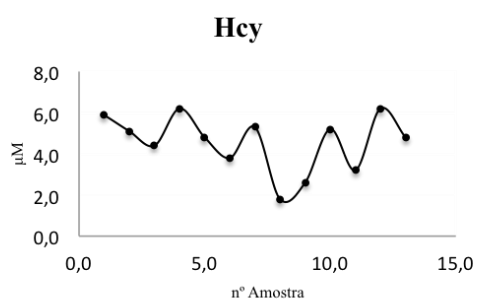
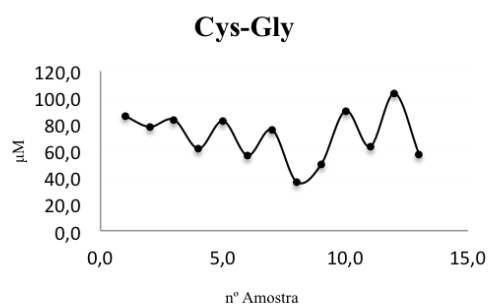
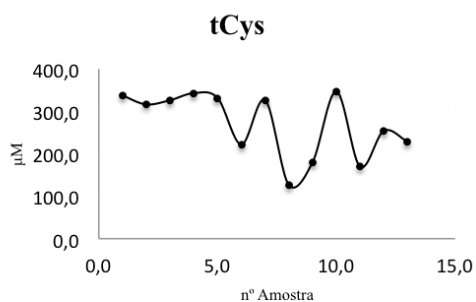


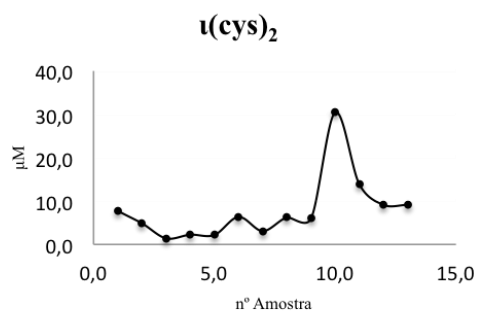
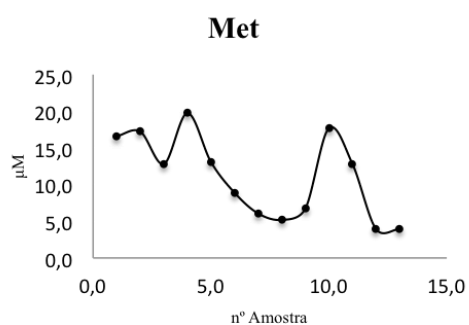
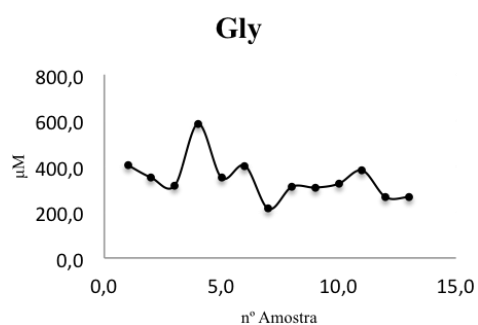
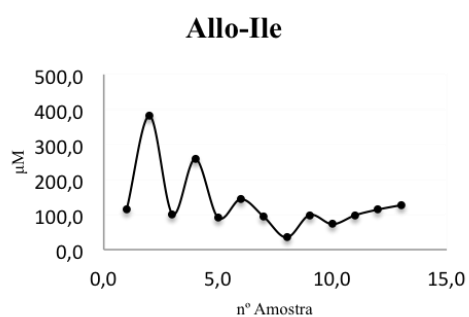
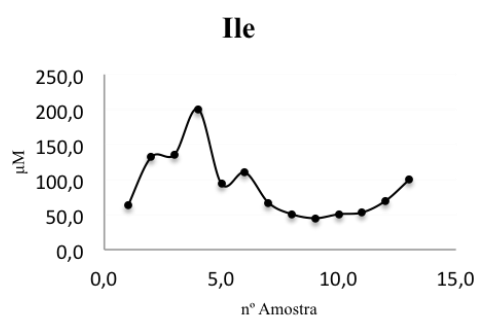
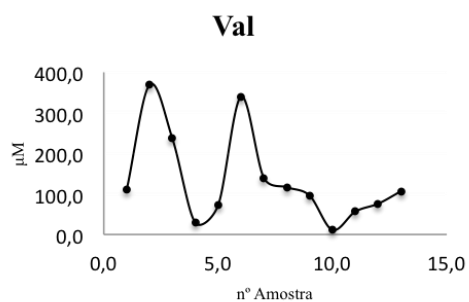
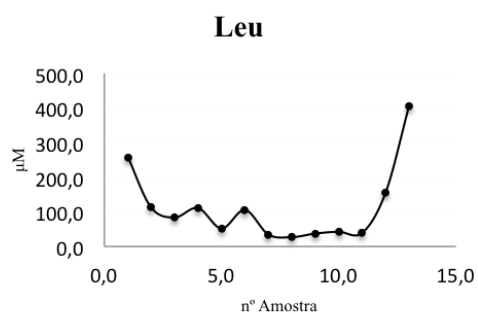


## MSUD – Doente 2

Metabolitos (µM)											
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	t(cys) <sub>2</sub>
1	337,0	86,1	5,9	9,1	257,3	109,8	63,4	114,8	403,1	16,6	7,6
2	316,5	78,0	5,1	7,8	112,6	368,7	131,9	381,7	350,4	17,2	4,9
3	326,4	83,3	4,4	6,5	83,9	236,5	135,9	101,5	315,1	12,8	1,4
4	343,0	61,6	6,2	4,5	111,0	29,1	200,7	258,9	585,0	19,7	2,2
5	331,5	82,4	4,8	3,6	52,0	72,1	93,7	91,2	349,9	13,1	2,2
6	222,1	56,5	3,8	3,9	105,3	339,7	110,1	144,1	402,0	8,9	6,3
7	326,5	75,7	5,3	5,3	34,6	139,8	67,0	93,4	214,6	6,1	3,1
8	126,9	36,7	1,8	2,4	27,0	116,6	50,5	34,5	310,2	5,2	6,2
9	180,3	49,6	2,6	5,0	37,3	95,7	44,8	98,7	307,0	6,7	6,0
10	347,0	89,9	5,2	4,4	42,5	11,5	50,5	72,6	323,9	17,7	30,4
11	169,9	63,2	3,2	7,9	39,3	56,4	53,0	98,2	381,6	12,8	13,9
12	254,0	103,1	6,2	9,0	155,7	75,9	69,7	114,5	265,5	3,9	9,1
13	229,0	57,4	4,8	5,4	405,5	106,8	99,6	126,8	265,5	3,9	9,1
média	270,0	71,0	4,6	5,8	112,6	135,3	90,1	133,1	344,1	11,1	7,9
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	46,5	80,2	26,7	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	109,0	245,7	52,6	514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

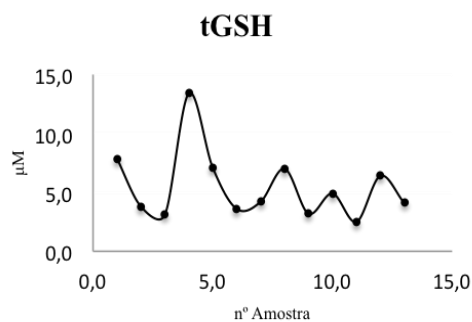
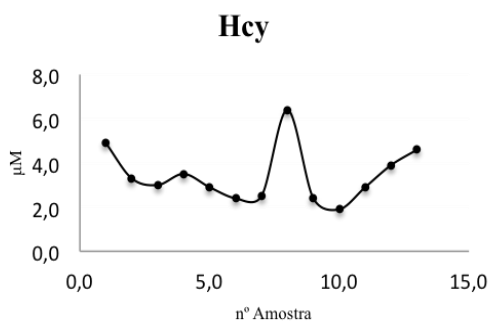
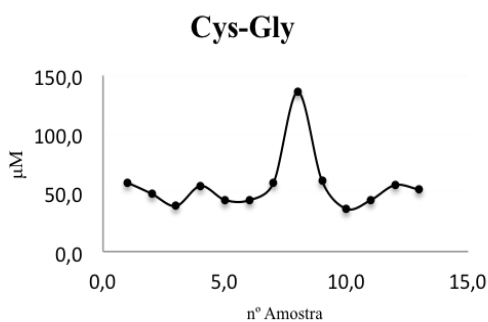
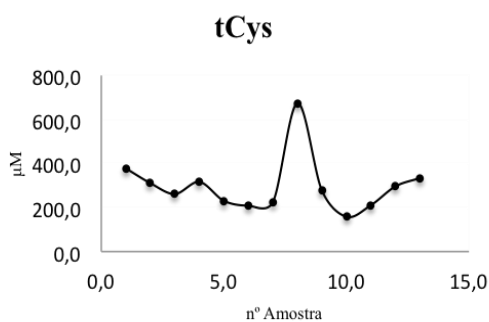


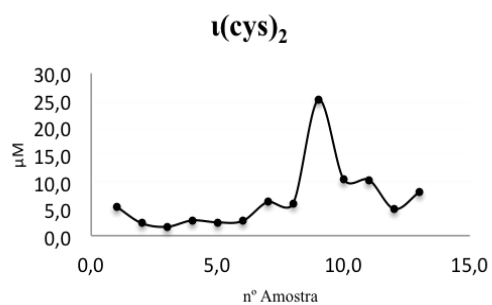
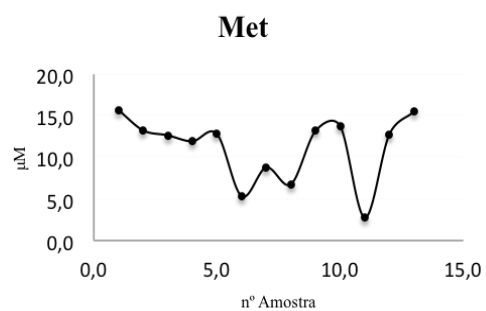
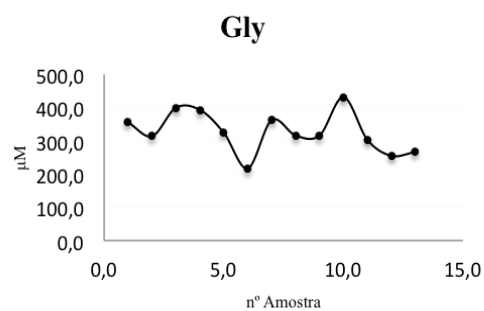
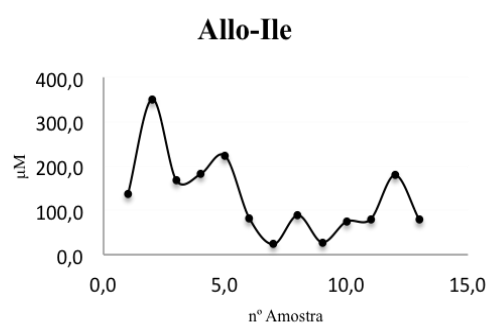
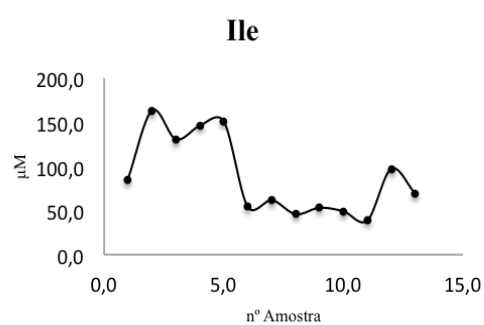
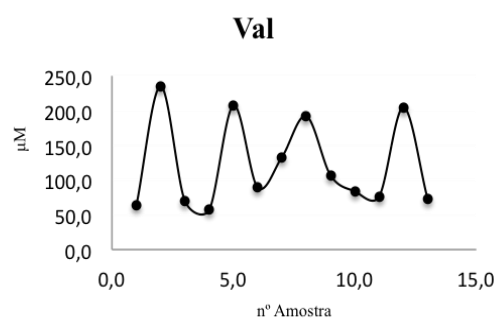
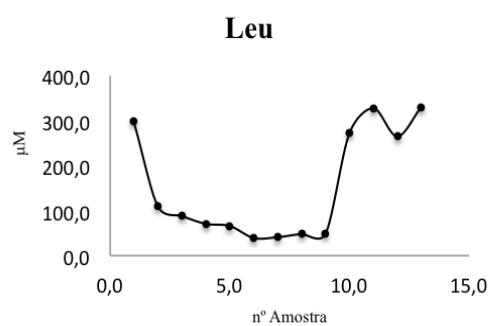


## MSUD – Doente 3

Metabolitos (µM)											
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	t(cys) <sub>2</sub>
1	378,6	59,0	4,9	7,8	298,2	63,2	85,2	138,0	356,5	15,7	5,4
2	310,9	49,2	3,3	3,8	109,3	235,0	163,2	350,6	313,7	13,3	2,3
3	261,6	38,9	3,0	3,1	87,9	70,5	130,7	167,4	399,1	12,7	1,6
4	316,1	55,8	3,5	13,4	70,6	57,1	146,0	182,0	393,0	11,9	2,8
5	230,7	44,0	2,9	7,1	65,7	207,4	150,8	223,0	324,0	12,8	2,5
6	208,5	43,7	2,4	3,6	39,2	89,6	54,3	82,3	216,7	5,3	2,7
7	225,0	58,4	2,5	4,2	40,9	133,2	61,8	23,6	361,7	8,8	6,3
8	674,1	135,9	6,4	7,0	47,9	192,1	45,9	88,8	316,0	6,8	6,0
9	277,8	60,0	2,4	3,2	48,7	106,9	53,0	27,9	315,8	13,2	25,1
10	158,2	36,4	1,9	4,9	271,9	83,8	49,1	74,5	431,1	13,8	10,4
11	210,7	43,8	2,9	2,5	327,5	76,5	38,8	80,3	303,1	2,8	10,3
12	296,0	56,6	3,9	6,4	265,1	204,7	97,2	179,3	254,8	12,8	4,9
13	333,9	52,7	4,6	4,1	330,1	72,5	69,2	78,5	266,2	15,5	8,1
média	298,6	56,5	3,4	5,5	154,1	122,5	88,1	130,5	327,0	11,2	6,8
v.r. <sup>a</sup>	Mín. 140,0	Mín. 32,0	Mín. 4,0	Mín. 5,0	Mín. 46,5	Mín. 80,2	Mín. 26,7	Mín. n.d.	Mín. 227,8	Mín. 8,7	Mín. 20,0
	Máx. 198,0	Máx. 34,0	Máx. 7,0	Máx. 8,0	Máx. 109,0	Máx. 245,7	Máx. 52,6	Máx. n.d.	Máx. 514,2	Máx. 40,9	Máx. 60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

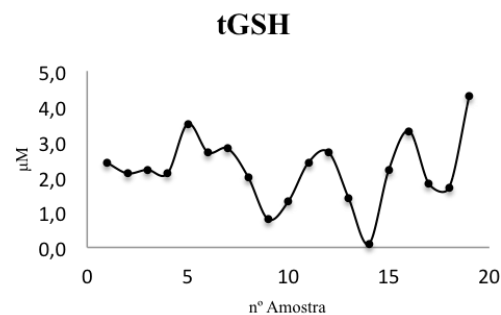
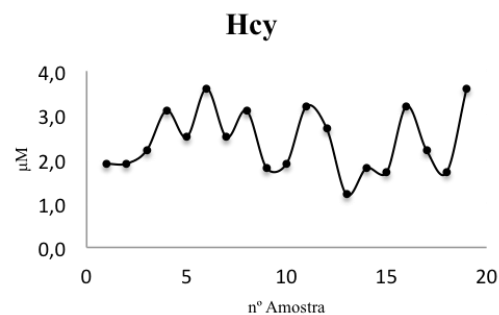
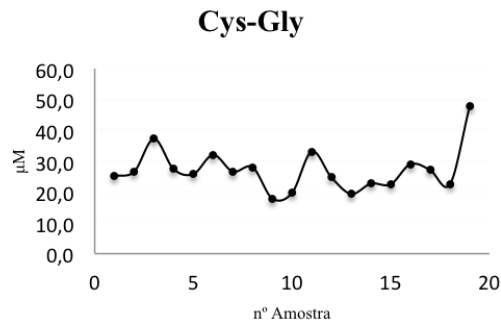
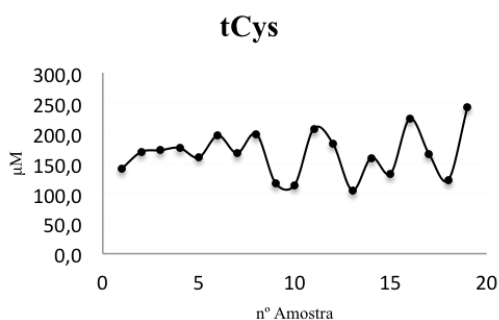


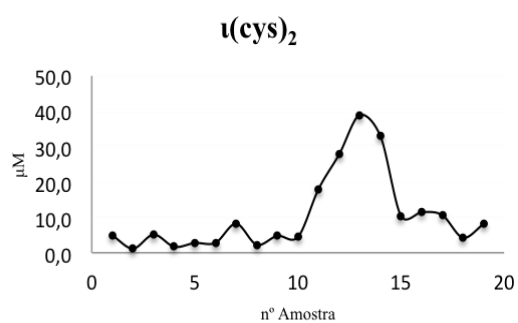
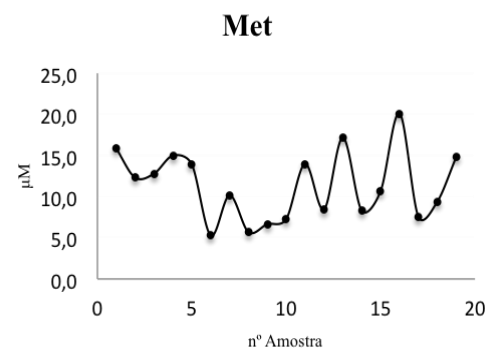
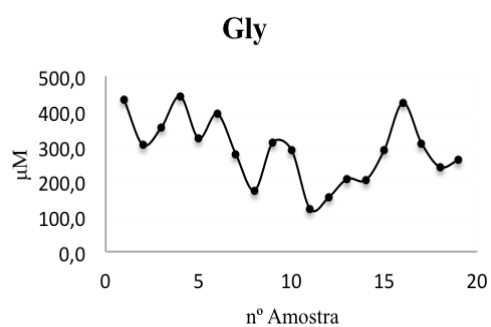
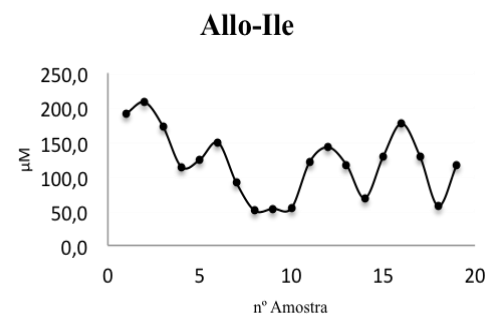
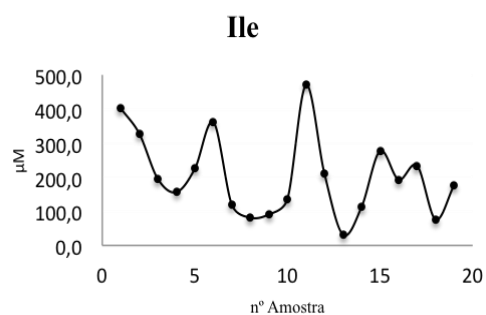
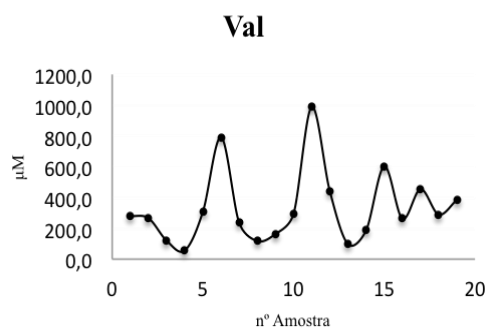
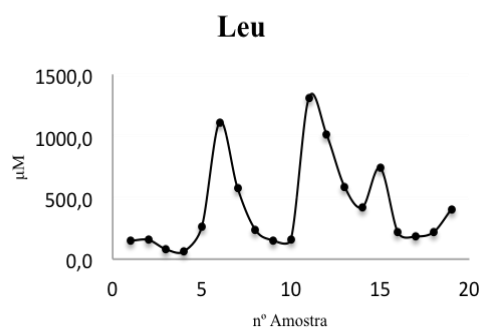


## MSUD – Doente 4

Metabolitos (µM)												
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	GSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	t(cys) <sub>2</sub>	
1	141,3	25,1	1,9	2,4	147,5	280,7	401,6	191,2	431,3	15,8	4,9	
2	168,6	26,6	1,9	2,1	156,1	265,9	327,7	207,4	304,5	12,3	1,2	
3	171,5	37,2	2,2	2,2	79,5	120,1	195,3	172,5	354,5	12,8	5,1	
4	175,4	27,4	3,1	2,1	63,6	56,1	156,4	114,0	442,3	15,0	1,7	
5	159,6	25,8	2,5	3,5	264,6	308,1	225,0	124,1	322,9	13,9	2,7	
6	195,9	32,0	3,6	2,7	1111,4	791,8	361,2	149,0	392,0	5,3	2,8	
7	166,7	26,6	2,5	2,8	578,5	236,9	119,3	90,8	278,1	10,2	8,2	
8	198,6	28,0	3,1	2,0	238,7	117,7	81,4	50,6	174,5	5,7	2,3	
9	117,2	17,9	1,8	0,8	153,0	163,2	91,3	53,4	311,7	6,7	4,8	
10	114,1	19,7	1,9	1,3	162,6	294,6	136,1	54,0	289,6	7,3	4,5	
11	207,4	33,1	3,2	2,4	1307,3	988,0	470,2	121,2	121,5	14,0	18,0	
12	182,1	24,7	2,7	2,7	1011,0	441,5	210,2	142,3	154,4	8,5	27,8	
13	105,4	19,4	1,2	1,4	589,7	96,9	31,9	116,9	207,2	17,2	38,9	
14	159,0	22,7	1,8	0,1	420,9	187,9	112,6	68,6	204,1	8,3	32,9	
15	133,0	22,5	1,7	2,2	741,7	601,8	276,6	128,9	290,6	10,7	10,4	
16	223,6	29,0	3,2	3,3	216,2	263,3	193,0	176,6	423,7	20,1	11,5	
17	165,5	27,1	2,2	1,8	184,3	453,9	233,7	129,3	308,4	7,6	10,6	
18	122,2	22,5	1,7	1,7	220,5	290,0	76,2	57,1	241,0	9,4	4,3	
19	242,2	47,7	3,6	4,3	406,8	384,3	176,7	116,4	261,7	14,8	8,1	
média	165,8	27,1	2,4	2,2	423,9	333,8	204,0	119,2	290,2	11,3	10,6	
v.r. <sup>a</sup>	Min.	140,0	32,0	4,0	5,0	46,5	80,2	26,7	n.d.	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	109,0	245,7	52,6		514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

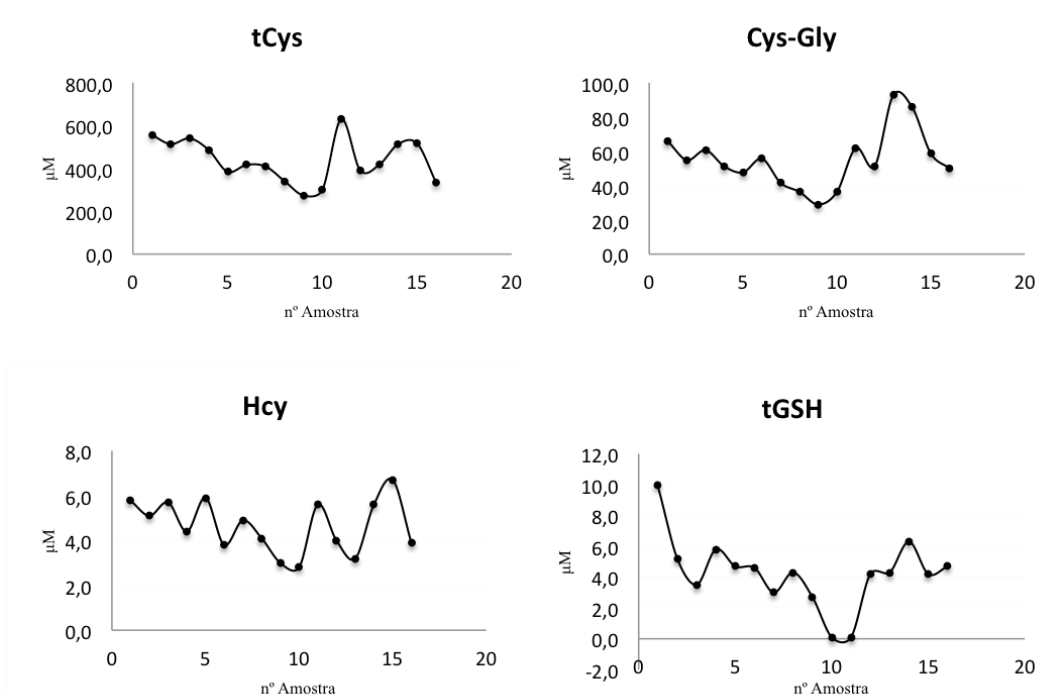


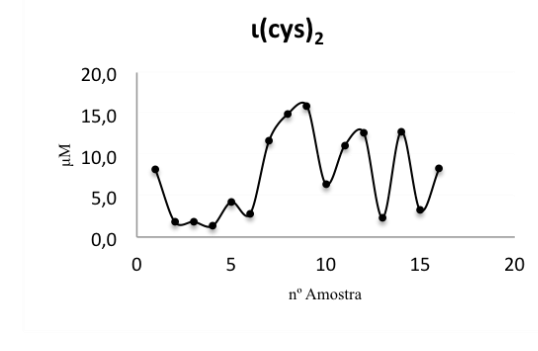
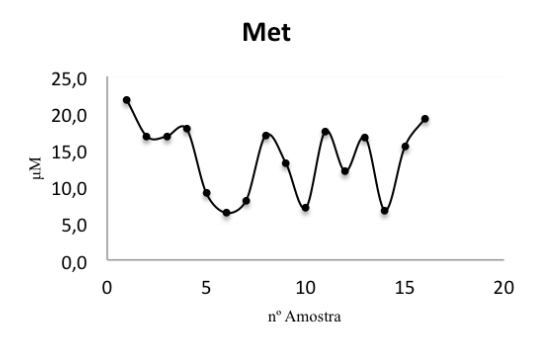
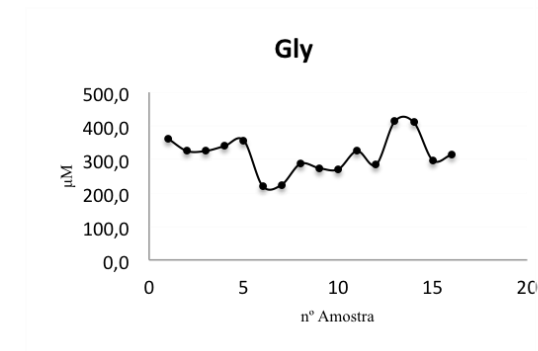
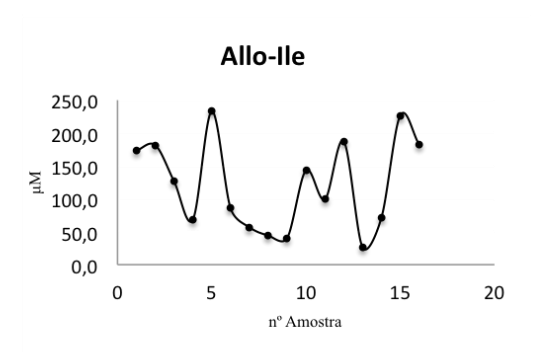
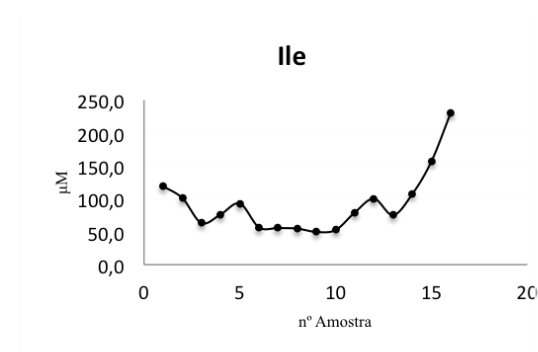
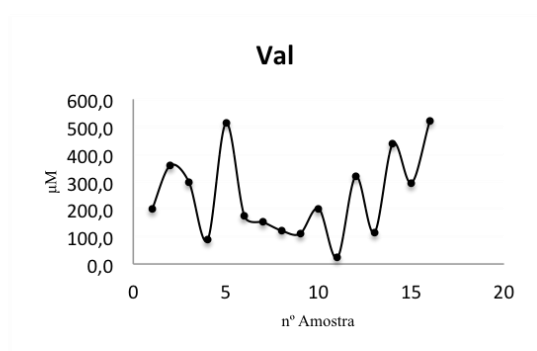
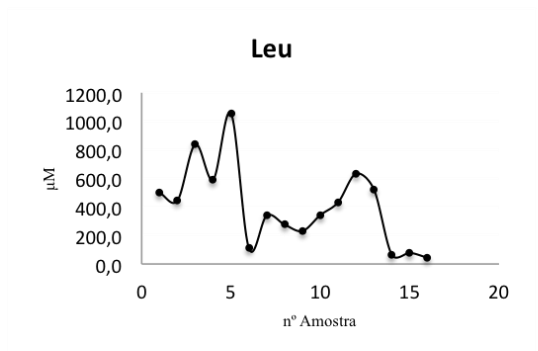


## MSUD – Doente 5

Metabolitos (μM)												
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	t(cys) <sub>2</sub>
1		555,1	66,0	5,8	10,0	500,4	201,1	118,8	173,4	362,0	21,8	8,3
2		513,3	54,8	5,1	5,2	444,6	358,7	101,1	181,5	325,0	16,8	1,9
3		539,6	60,6	5,7	3,5	838,3	298,7	63,3	126,6	325,0	16,8	1,9
4		485,6	51,1	4,4	5,8	591,8	87,3	76,4	68,7	339,9	17,8	1,3
5		384,0	47,7	5,9	4,7	1054,5	512,8	92,9	233,1	356,7	9,1	4,3
6		416,3	55,6	3,8	4,6	111,1	173,7	56,7	85,6	220,6	6,4	2,8
7		408,9	41,5	4,9	3,0	339,1	152,3	55,7	56,8	223,8	8,1	11,7
8		340,7	36,3	4,1	4,3	276,1	121,6	54,8	44,3	286,5	17,0	15,0
9		273,7	28,9	3,0	2,7	231,7	110,6	49,7	40,5	273,8	13,2	16,0
10		299,7	36,4	2,8	0,1	342,7	201,7	52,7	143,2	270,4	7,1	6,5
11		629,2	61,8	5,6	0,1	433,3	22,7	79,3	99,2	324,8	17,5	11,1
12		391,3	51,2	4,0	4,2	633,2	319,0	100,2	187,6	283,9	12,1	12,7
13		416,2	92,7	3,2	4,3	522,0	113,8	75,3	26,6	413,5	16,7	2,3
14		512,5	85,6	5,6	6,3	65,1	438,3	107,1	71,3	410,3	6,7	12,8
15		516,0	58,6	6,7	4,2	78,2	295,1	156,9	226,5	297,5	15,4	3,2
16		335,1	50,0	3,9	4,7	43,8	522,1	230,1	182,8	314,2	19,2	8,3
média		438,6	54,9	4,7	4,2	406,6	245,6	91,9	121,7	314,2	13,9	7,5
v.r. *	Máx.	140,0	32,0	4,0	5,0	46,5	80,2	26,7	n.d.	227,8	8,7	20,0
	Mín.	198,0	34,0	7,0	8,0	109,0	245,7	52,6	n.d.	514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



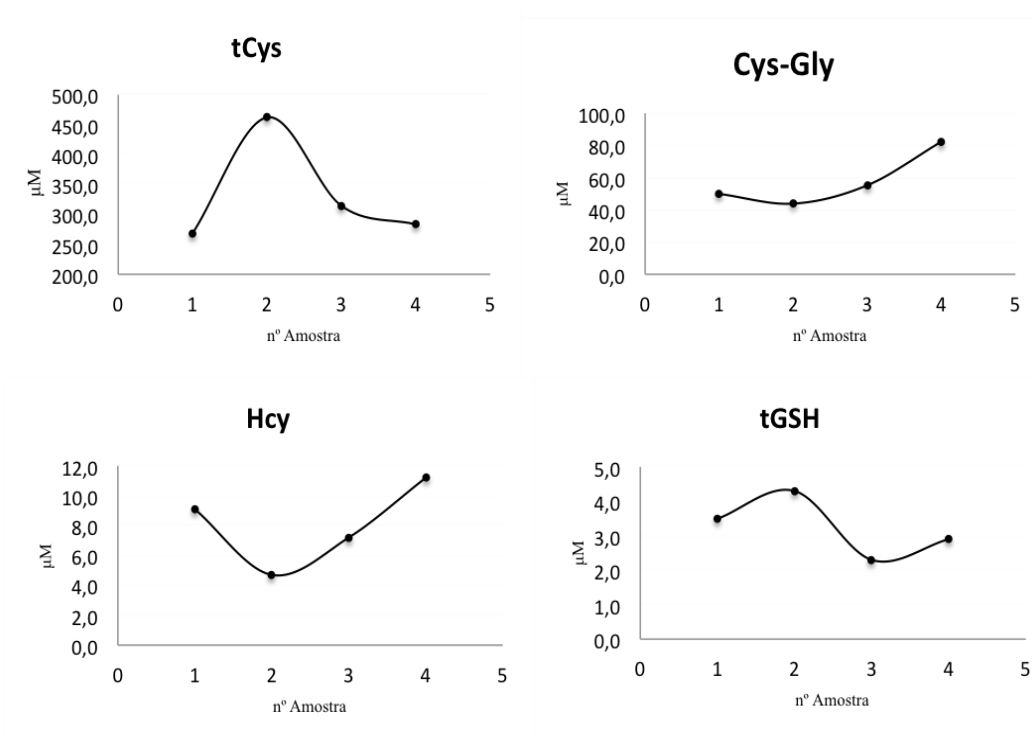


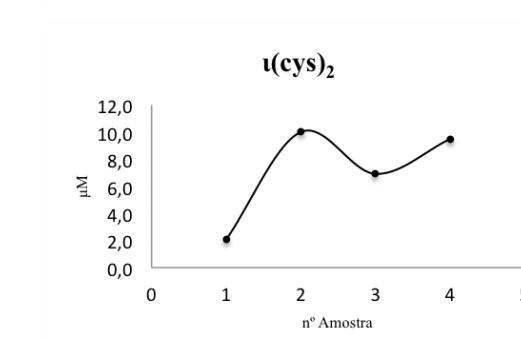
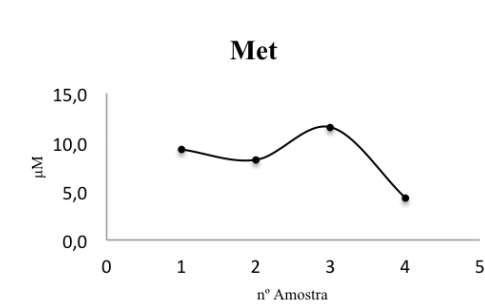
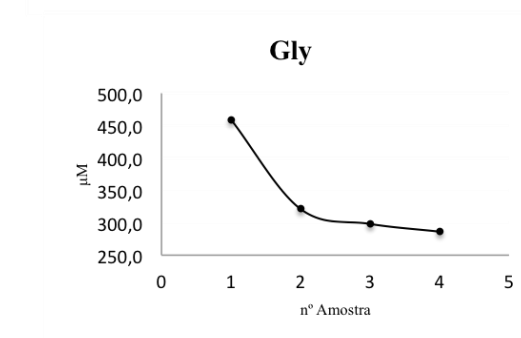
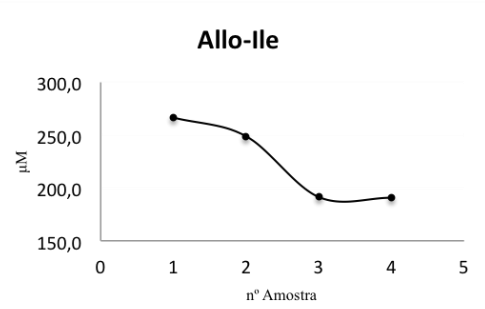
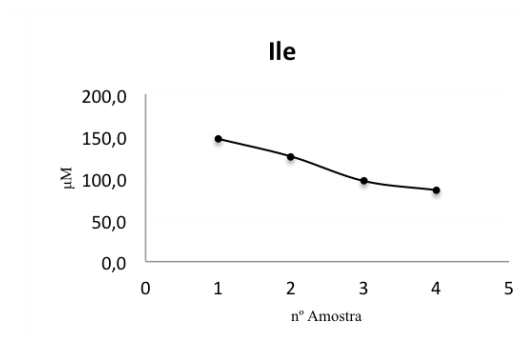
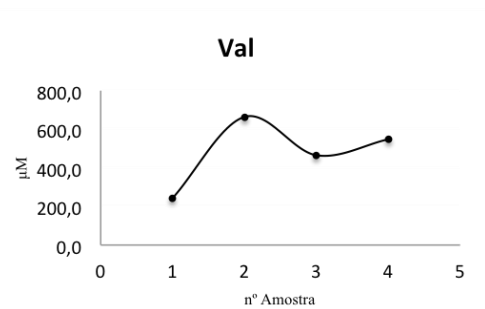
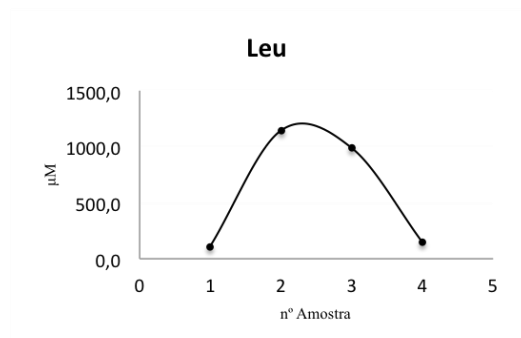


## MSUD – Doente 6

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )											
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	t(cys) <sub>2</sub>
1	268,3	50,0	9,1	3,5	109,1	241,3	146,3	266,6	458,7	9,3	2,1
2	462,2	43,9	4,7	4,3	1145,0	664,1	125,5	248,9	321,3	8,2	10,0
3	314,4	55,3	7,2	2,3	988,1	465,2	96,3	191,4	298,2	11,5	6,9
4	283,3	82,4	11,2	2,9	146,7	547,9	85,3	190,7	286,3	4,3	9,5
média	332,1	57,9	8,1	3,3	597,2	479,6	113,4	224,4	341,1	8,3	7,1
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	46,5	80,2	26,7	n.d.	227,8	8,7	20,0
	Máx	198,0	34,0	7,0	109,0	245,7	52,6		514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

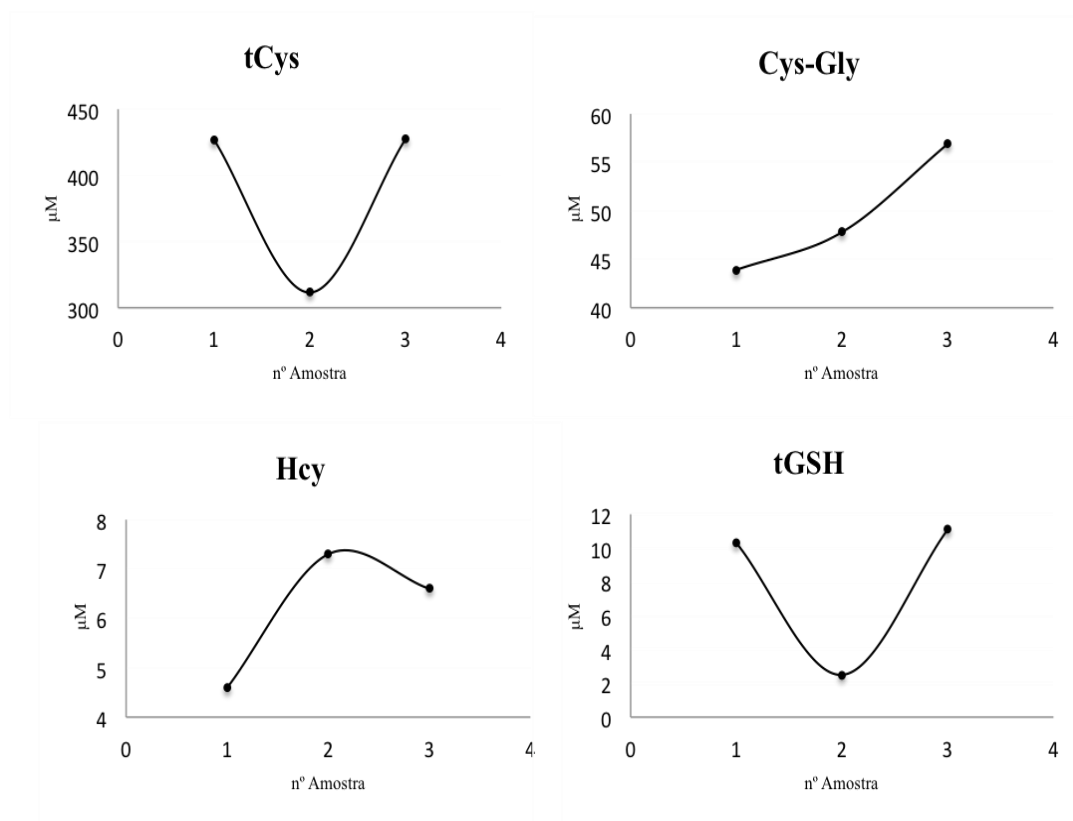


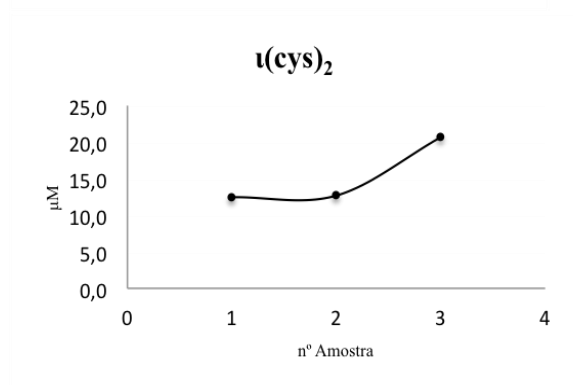
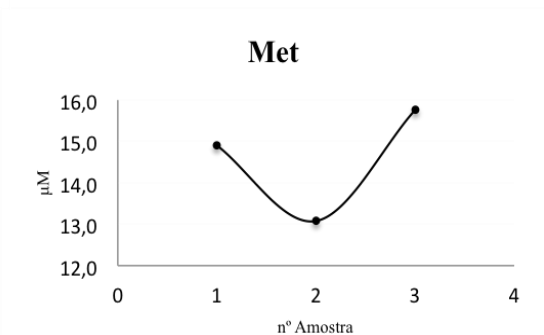
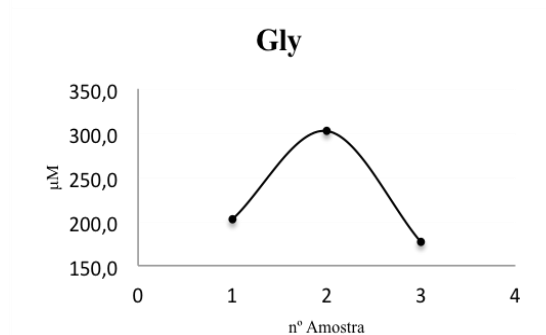
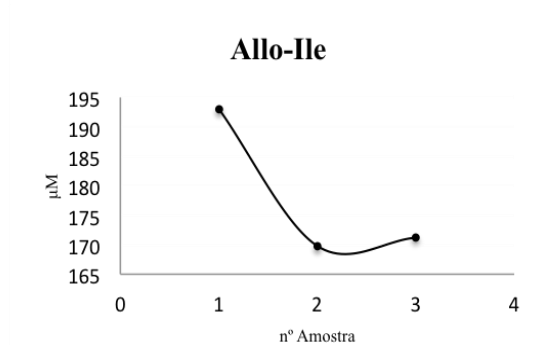
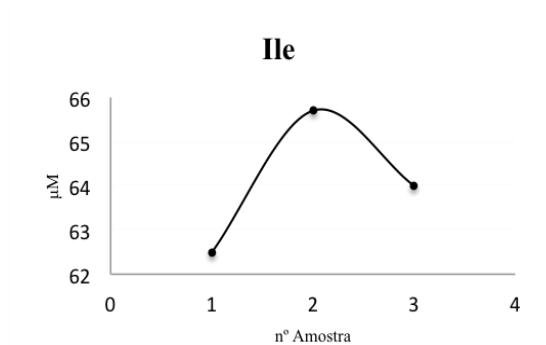
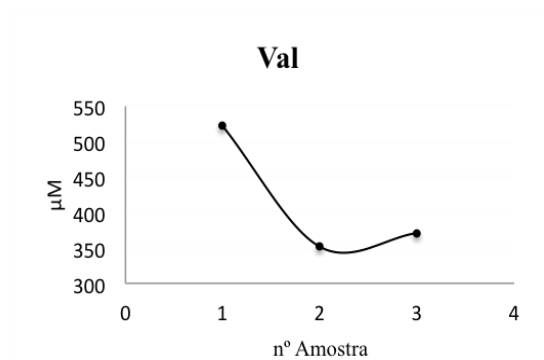
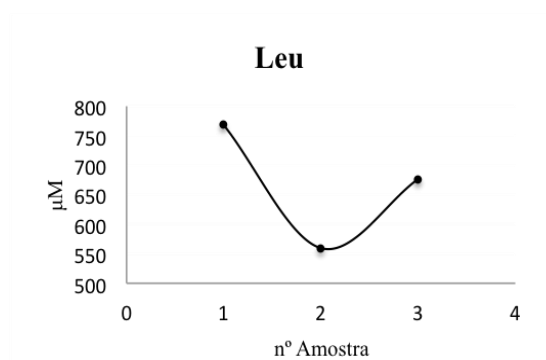


## MSUD – Doente 7

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )												
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	I(cys) <sub>2</sub>	
1	426,3	43,9	4,6	10,3	769,4	522,4	62,5	192,9	202,4	14,9	12,5	
2	311,5	47,8	7,3	2,5	559,5	351,5	65,7	169,8	302,2	13,1	12,7	
3	427,4	56,9	6,6	11,1	676,6	370,9	64,0	171,2	176,5	15,8	20,7	
média	388,4	49,5	6,2	8,0	668,5	414,9	64,1	178,0	227,0	14,6	15,3	
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	46,5	80,2	26,7	n.d.	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	109,0	245,7	52,6		514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

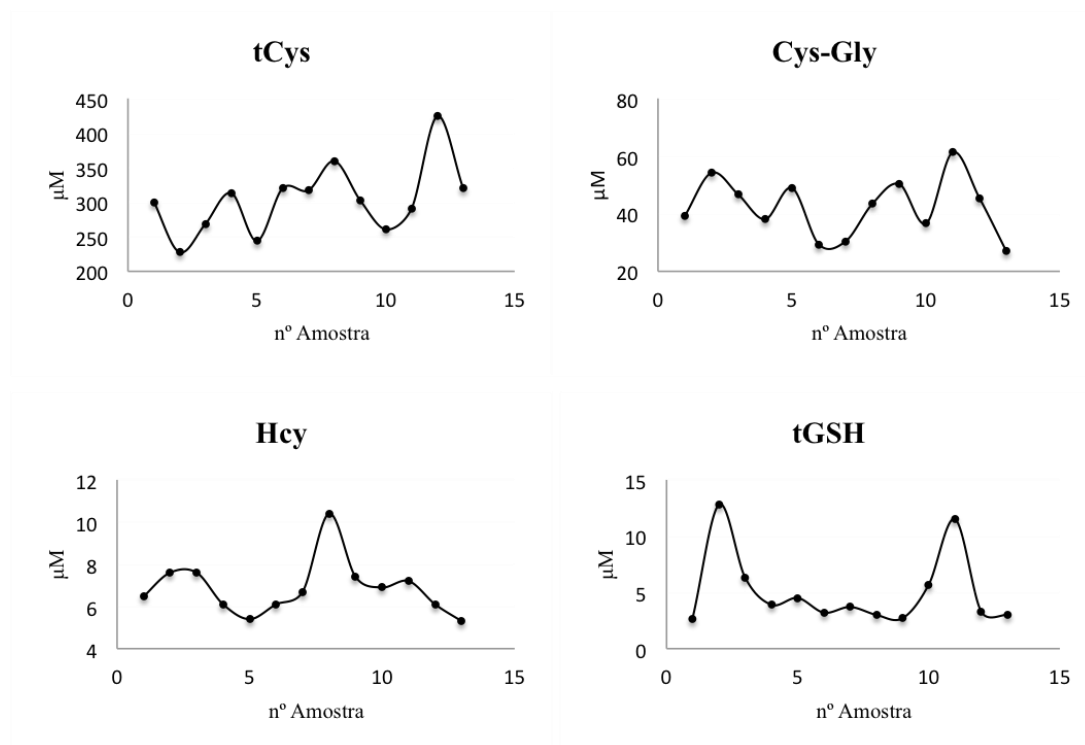


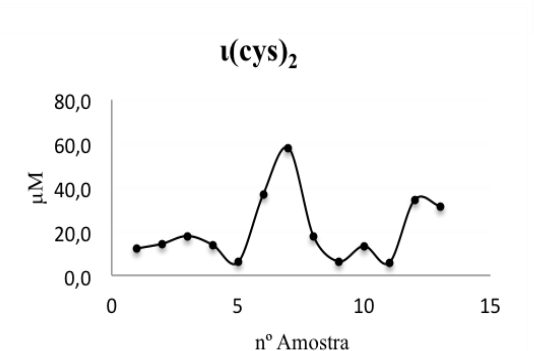
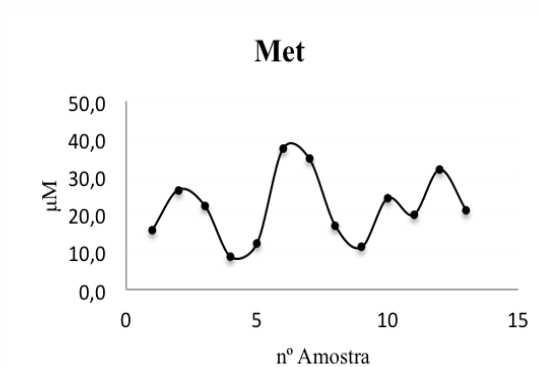
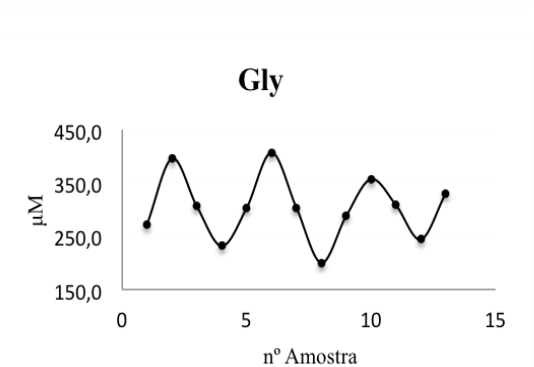
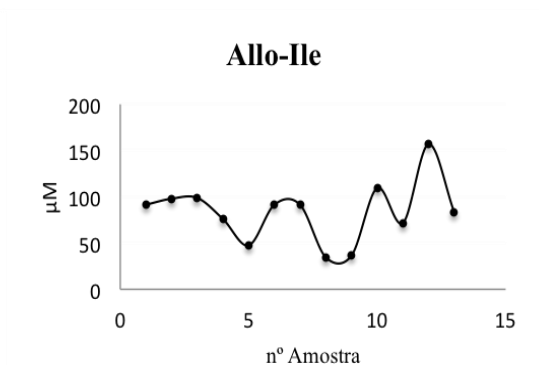
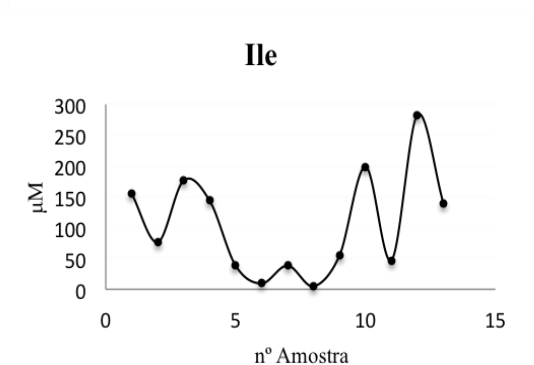
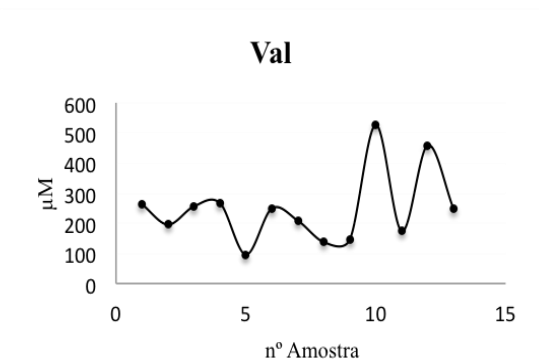
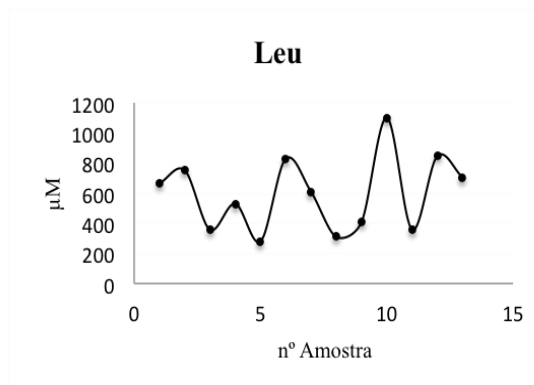


## MSUD – Doente 8

Metabolitos (µM)											
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Leu	Val	Ile	Allo-Ile	Gly	Met	t(cys) <sub>2</sub>
1	299,0	39,3	6,5	2,6	662,40	263,3	154,8	91,3	271,0	15,7	12,3
2	227,7	54,2	7,6	12,8	751,00	195,7	76,5	98,0	395,7	26,4	14,4
3	268,3	46,6	7,6	6,3	358,10	255,8	176,5	98,7	306,1	22,3	17,9
4	313,2	38,1	6,1	3,9	528,90	266,8	143,6	75,9	231,6	8,7	13,9
5	243,9	48,9	5,4	4,5	279,90	95,9	38,4	47,5	303,0	12,1	5,9
6	320,0	29,4	6,1	3,2	827,70	248,6	9,6	91,4	407,0	37,4	36,8
7	317,2	30,4	6,7	3,7	609,70	208,5	38,5	91,3	303,7	34,8	58,0
8	359,4	43,4	10,4	3,0	310,20	137,4	4,9	34,7	200,1	16,9	17,6
9	303,2	50,3	7,4	2,7	407,60	146,1	55,0	36,4	287,6	11,2	6,3
10	260,6	36,6	6,9	5,7	1100,70	526,7	198,8	109,4	357,1	24,2	13,3
11	290,8	61,3	7,2	11,5	358,10	173,4	47,0	71,8	308,7	19,8	5,8
12	424,3	45,4	6,1	3,3	844,90	458,6	282,9	156,9	243,9	31,8	34,4
13	320,5	27,0	5,3	3,0	705,30	247,1	139,4	83,4	330,1	21,1	31,5
média	303,7	42,4	6,9	5,1	595,73	248,0	105,1	83,6	303,5	21,7	20,6
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	4,0	46,5	80,2	26,7		227,8	8,7	20,0
	Min.	198,0	34,0	7,0	109,0	245,7	52,6	n.d.	514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

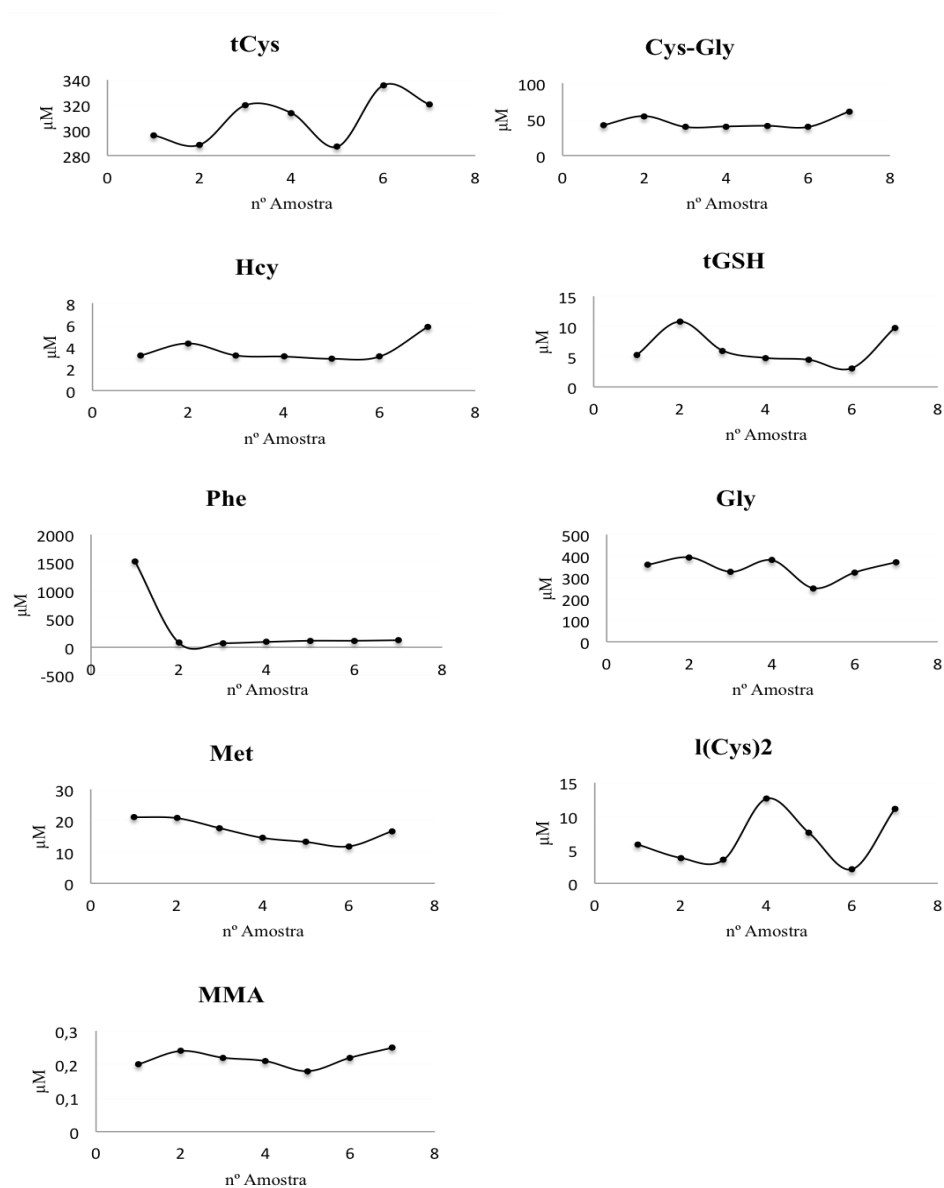




## PKU – Doente 1

Amostra	Metabolitos (µM)								
	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	296,0	42,2	3,2	5,3	1514,9	358,5	21,1	5,8	0,2
2	288,4	54,4	4,3	10,8	79,8	393,5	20,8	3,8	0,2
3	319,8	39,5	3,2	6,0	71,0	326,2	17,6	3,5	0,2
4	313,7	40,2	3,1	4,8	94,7	379,8	14,5	12,6	0,2
5	286,9	41,1	2,9	4,5	115,1	249,7	13,2	7,5	0,2
6	335,6	39,5	3,1	3,1	115,4	323,4	11,8	2,1	0,2
7	320,5	60,8	5,8	9,8	124,4	371,5	16,6	11,1	0,3
média	308,7	45,4	3,7	6,4	302,2	343,2	16,5	6,6	0,2
v.r. <sup>a</sup>	Min.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

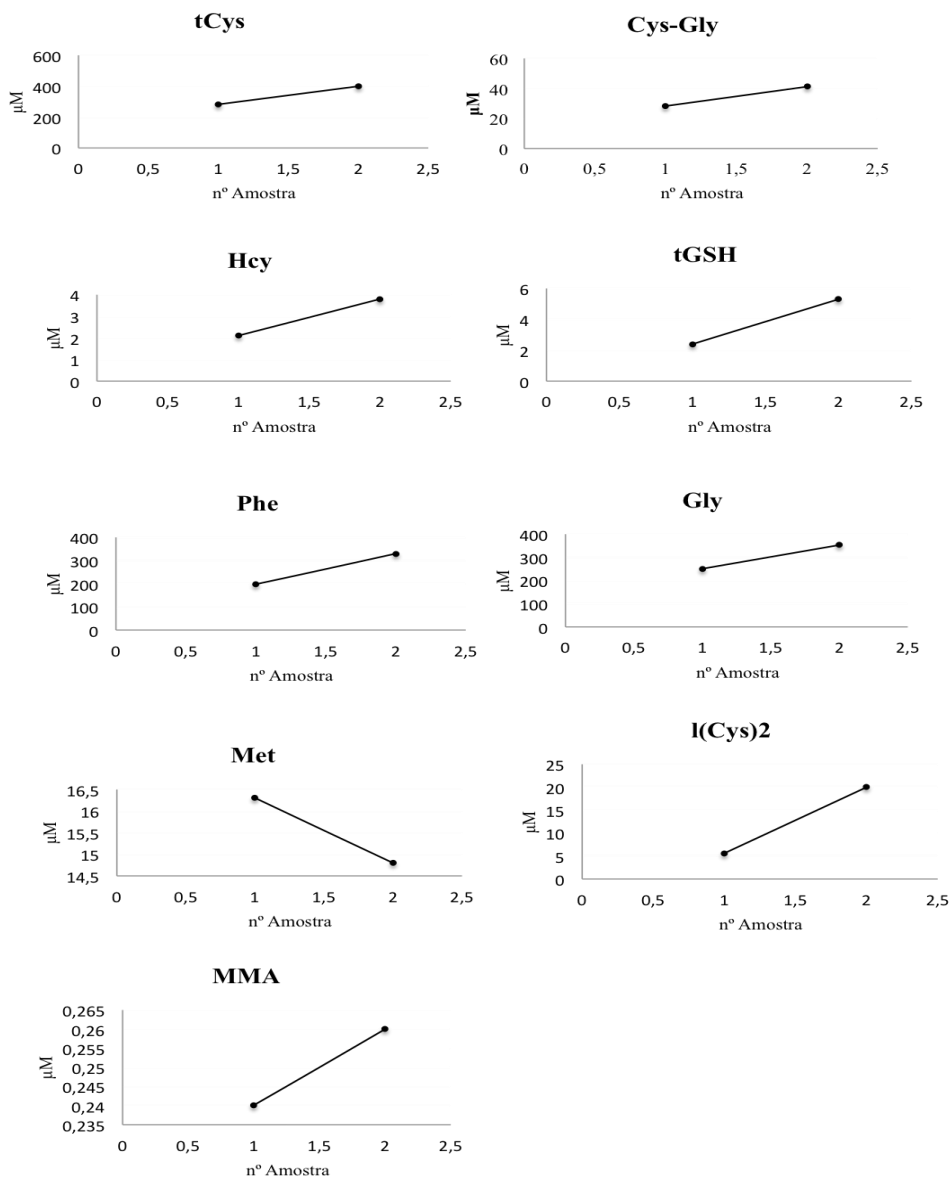
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 2

Metabolitos (µM)									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	282,2	28,3	2,1	2,4	196,1	251	16,3	5,6	0,24
2	399,4	41,2	3,8	5,3	329,8	353,2	14,8	20,0	0,26
média	340,8	34,8	2,9	3,9	262,9	302,1	15,6	12,8	0,25
v.r. <sup>a</sup>	Min.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

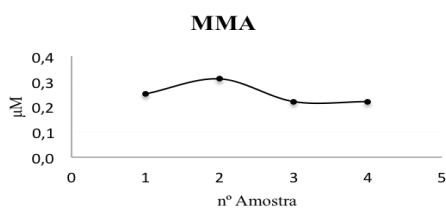
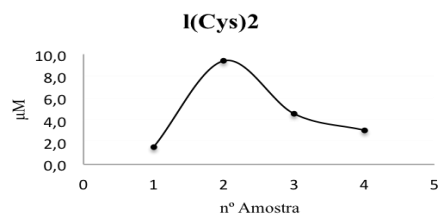
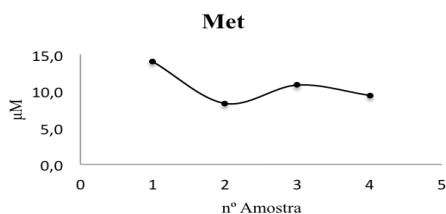
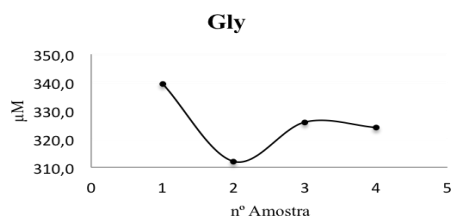
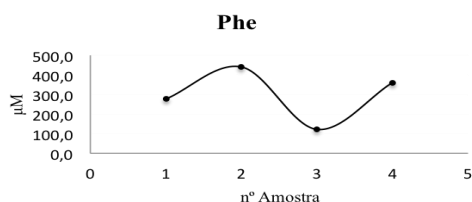
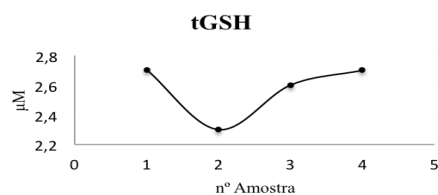
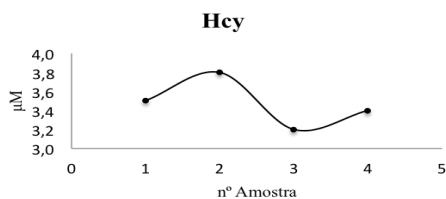
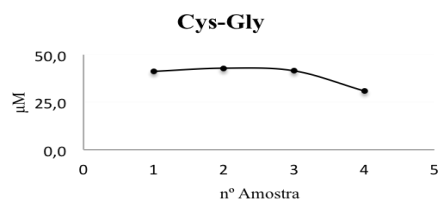
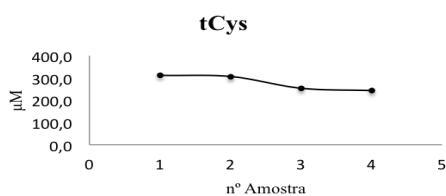




## PKU – Doente 3

		Metabolitos (μM)							
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2
1		310,4	41,2	3,5	2,7	277,3	339,6	14,0	1,6
2		306,6	42,9	3,8	2,3	440,5	312,1	8,3	9,4
3		253,8	41,5	3,2	2,6	122,2	326,0	10,8	4,6
4		243,3	30,9	3,4	2,7	360,9	324,1	9,4	3,1
média		278,5	39,1	3,5	2,6	300,2	325,5	10,6	4,7
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

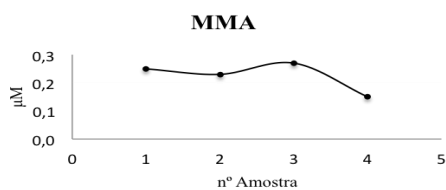
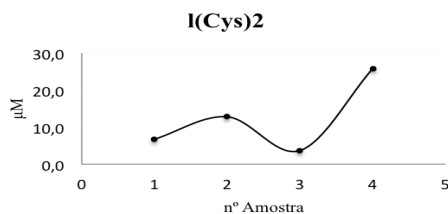
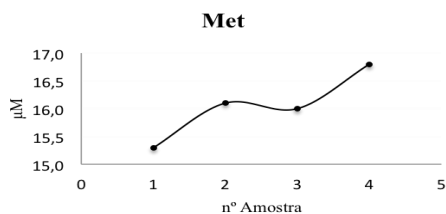
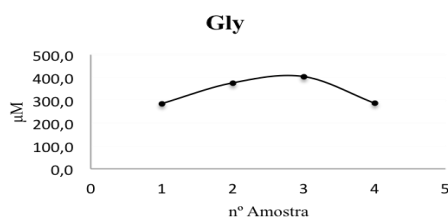
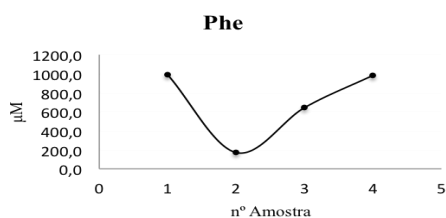
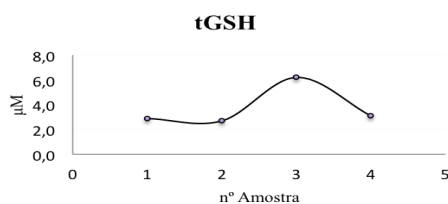
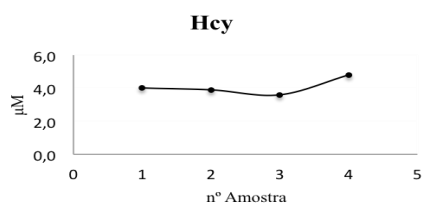
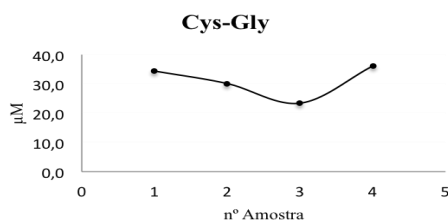
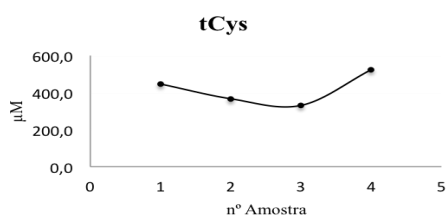
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 4

Metabolitos (µM)									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	446,5	34,4	4,0	2,9	991,1	286,0	15,3	6,8	0,3
2	366,7	30,1	3,9	2,7	170,5	376,5	16,1	12,8	0,2
3	330,6	23,4	3,6	6,2	643,5	404,3	16,0	3,7	0,3
4	523,4	36,1	4,8	3,1	982,8	287,7	16,8	25,8	0,2
média	416,8	31,0	4,1	3,7	697,0	338,6	16,1	12,3	0,2
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	40,9	60,0	0,4

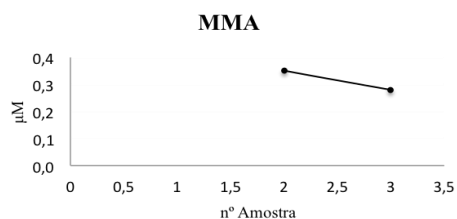
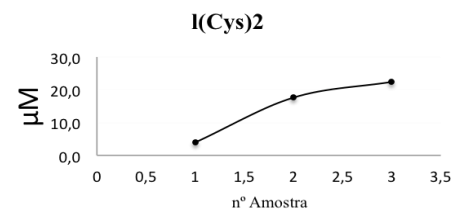
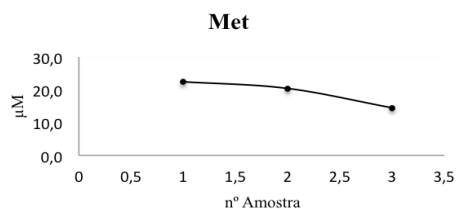
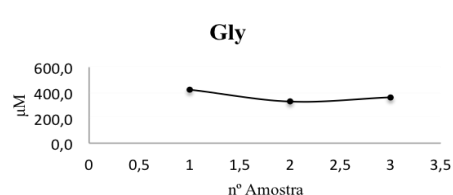
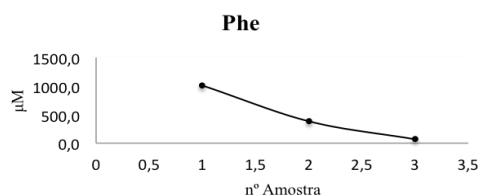
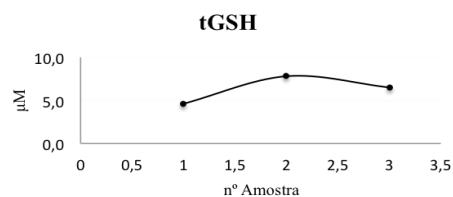
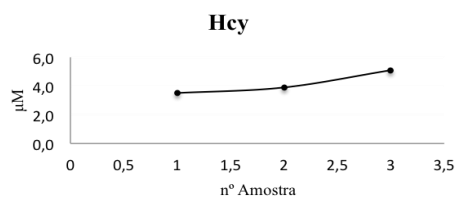
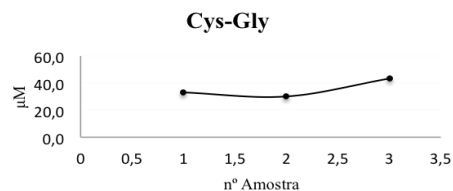
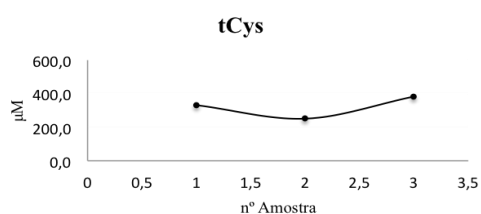
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 5

		Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )								
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1		332,8	33,0	3,5	4,6	1015,7	424,7	22,5	3,9	-
2		251,1	30,1	3,9	7,8	383,6	328,6	20,4	17,6	0,4
3		382,8	43,3	5,1	6,5	67,8	362,2	14,5	22,4	0,3
média		322,2	35,5	4,2	6,3	489,0	371,8	19,1	14,6	0,3
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0	0,4

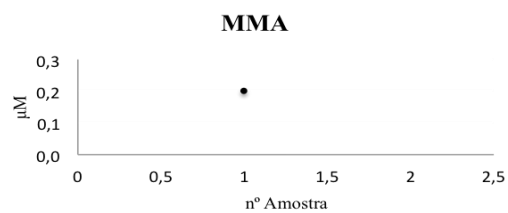
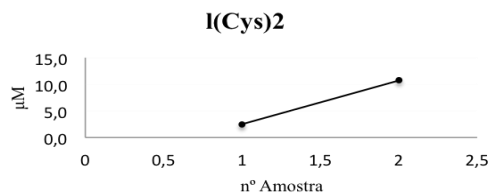
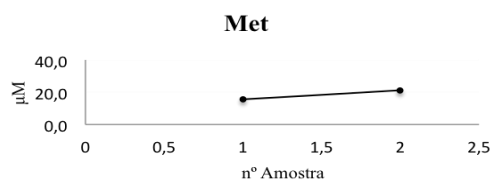
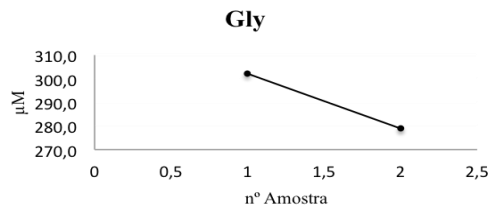
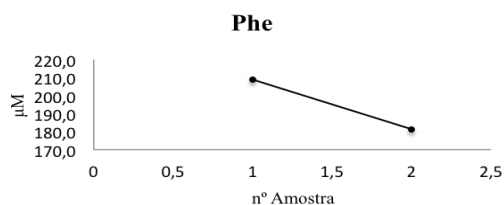
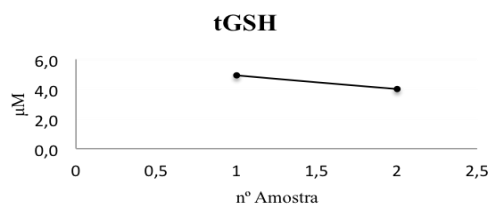
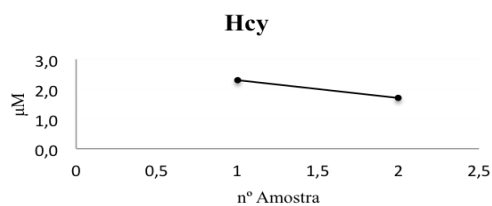
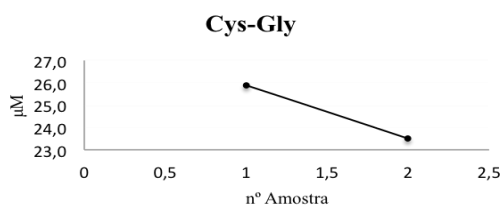
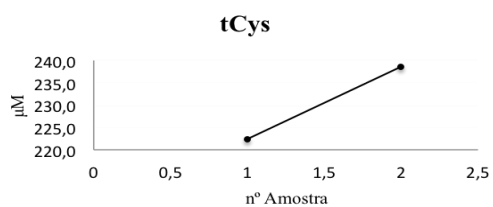
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 6

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	222,4	25,9	2,3	4,9	208,8	302,1	15,5	2,5	0,2
2	238,6	23,5	1,7	4,0	181,3	278,9	21,2	10,7	-
média	230,5	24,7	2,0	4,5	195,1	290,5	18,4	6,6	0,2
v.r. <sup>a</sup>	Máx. Mín.	140,0-198,0 32,0-34,0	4,0 7,0	5,0 8,0	41,8 110,2	227,8- 514,2	8,7 40,9	20,0 60,0	0,4

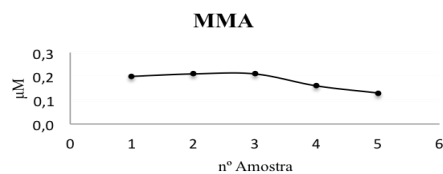
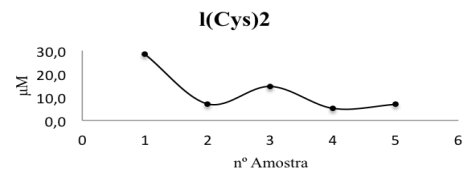
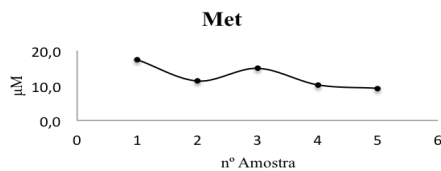
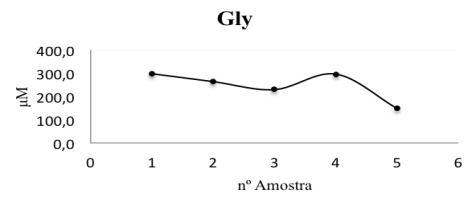
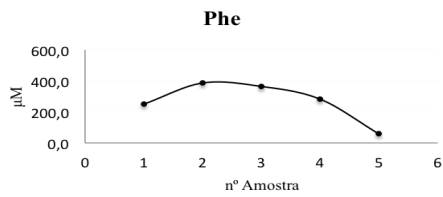
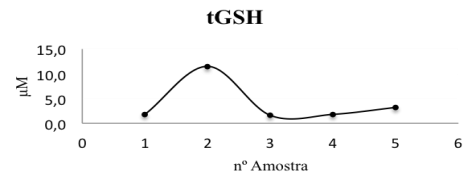
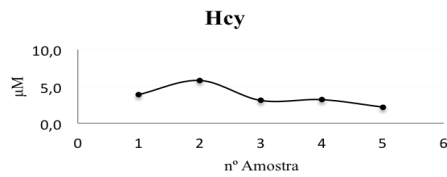
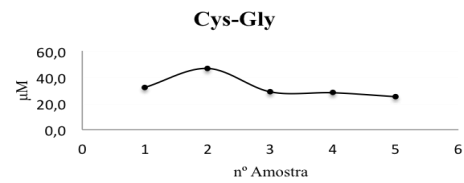
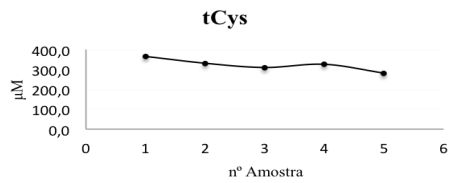
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 7

		Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )								
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1		365,8	32,2	3,9	1,8	248,5	297,5	17,4	28,4	0,2
2		330,7	46,6	5,8	11,5	386,0	263,2	11,3	7,1	0,2
3		309,5	28,8	3,1	1,6	364,0	229,1	14,9	14,6	0,2
4		325,5	28,1	3,2	1,8	282,0	295,6	10,2	5,2	0,2
5		281,2	25,1	2,2	3,2	58,2	148,1	9,2	6,9	0,1
média		322,5	32,2	3,6	4,0	267,7	246,7	12,6	12,4	0,2
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Mín.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0	

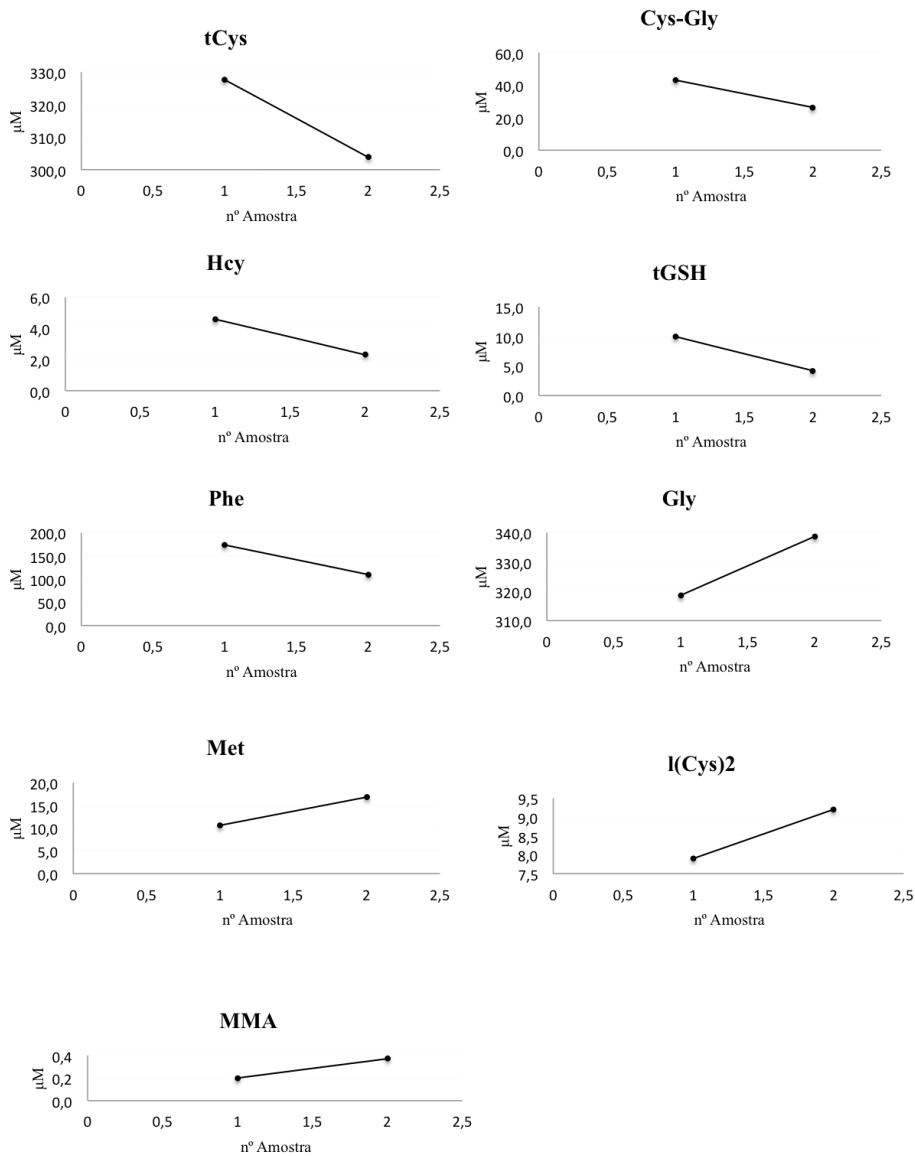
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – doente 8

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	327,7	43,0	4,6	9,9	173,8	318,7	10,6	7,9	0,2
2	303,8	26,3	2,3	4,2	109,8	338,7	16,8	9,2	0,4
média	315,8	34,7	3,5	7,1	141,8	328,7	13,7	8,6	0,3
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Mín.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

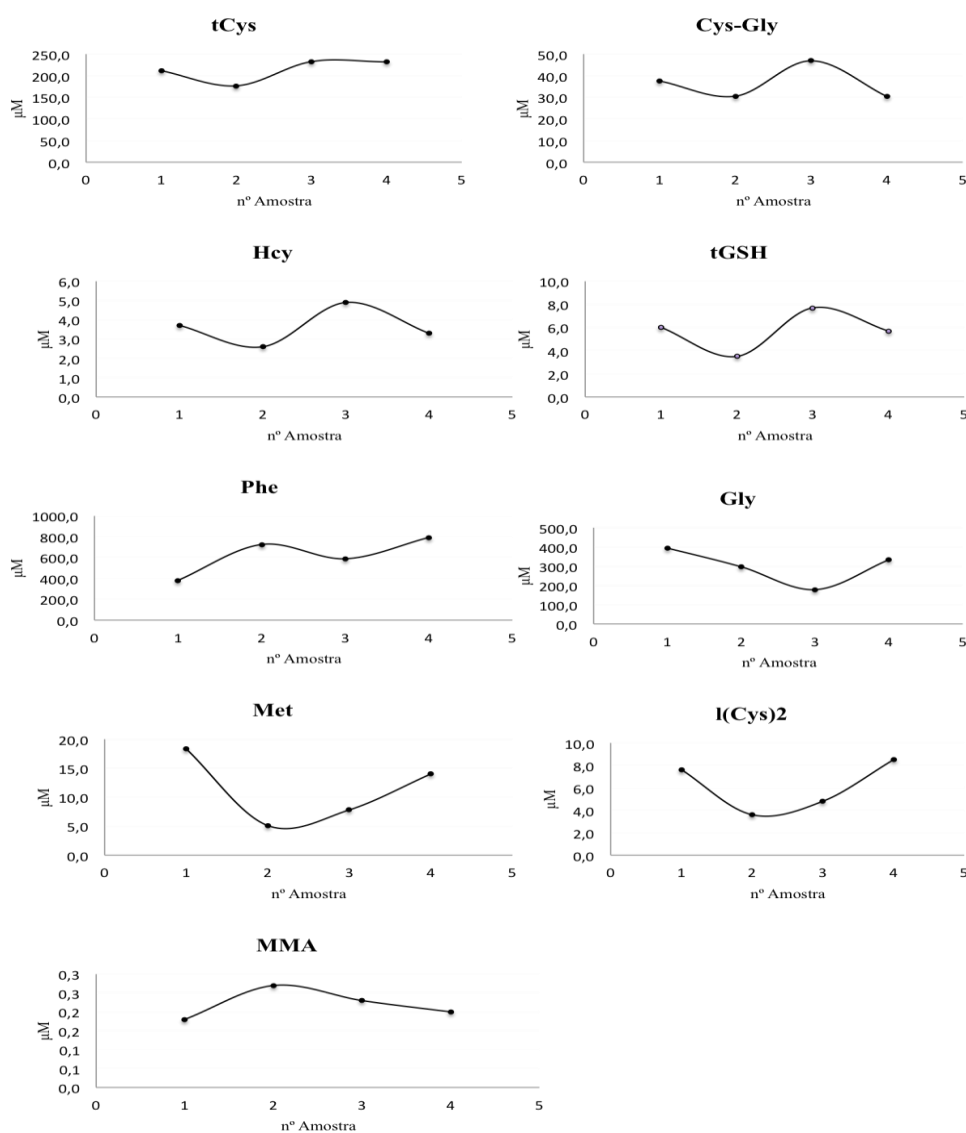
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 9

		Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )							
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2
1		211,5	37,7	3,7	6,0	381,0	394,9	18,3	7,6
2		176,6	30,5	2,6	3,5	726,1	296,4	5,1	3,6
3		232,6	46,9	4,9	7,7	589,2	177,9	7,8	4,8
4		231,9	30,4	3,3	5,7	793,3	333,2	14,0	8,5
média		213,2	36,4	3,6	5,7	622,4	300,6	11,3	6,1
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Mín.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

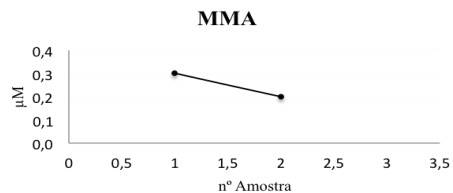
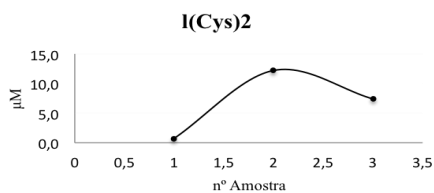
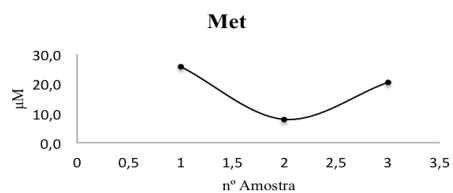
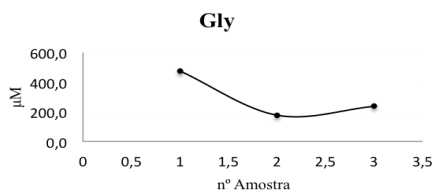
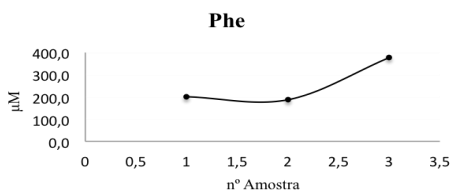
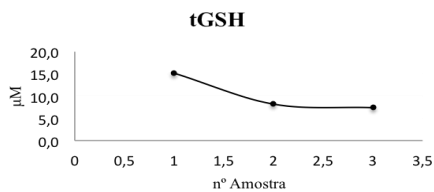
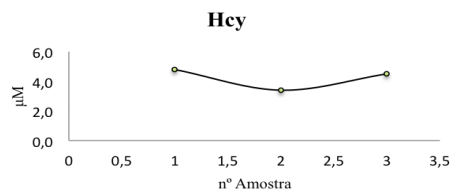
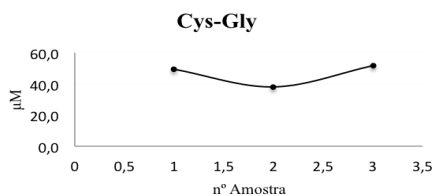
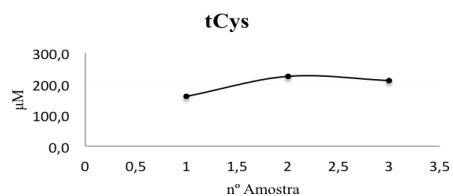
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 10

Metabolitos (µM)									
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2
1		159,6	49,4	4,8	15,2	201,7	474,1	25,7	0,7
2		224,3	38,1	3,4	8,2	187,3	176,7	7,9	12,2
3		210,9	51,7	4,5	7,4	376,9	236,4	20,4	7,4
média		198,3	46,4	4,2	10,3	255,3	295,7	18,0	6,8
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

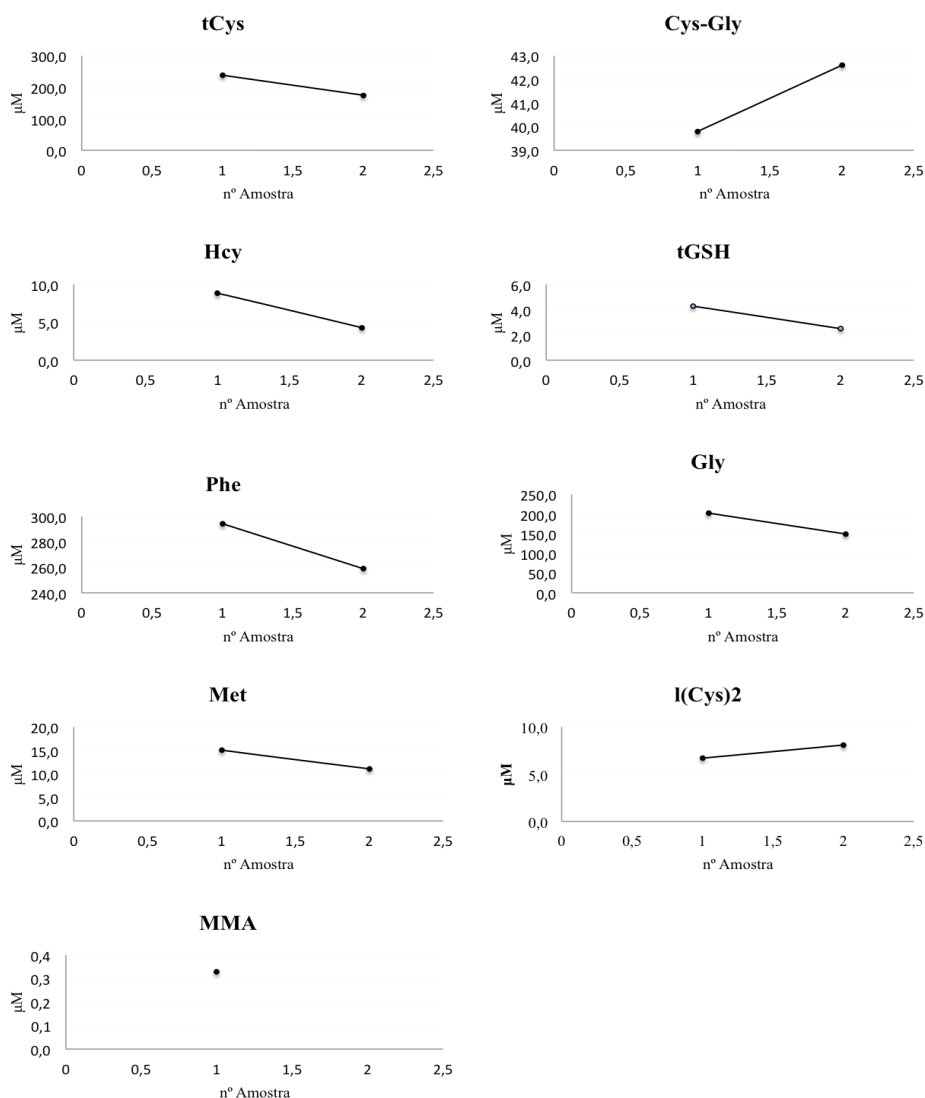




## PKU - Doente 11

Metabolitos (µM)									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	238,1	39,8	8,9	4,3	294,4	202,3	15,0	6,7	0,3
2	174,8	42,6	4,3	2,5	259,0	149,4	11,1	8,1	-
média	206,5	41,2	6,6	3,4	276,7	175,9	13,1	7,4	0,3
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Mín.	198,0	34,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0	0,4

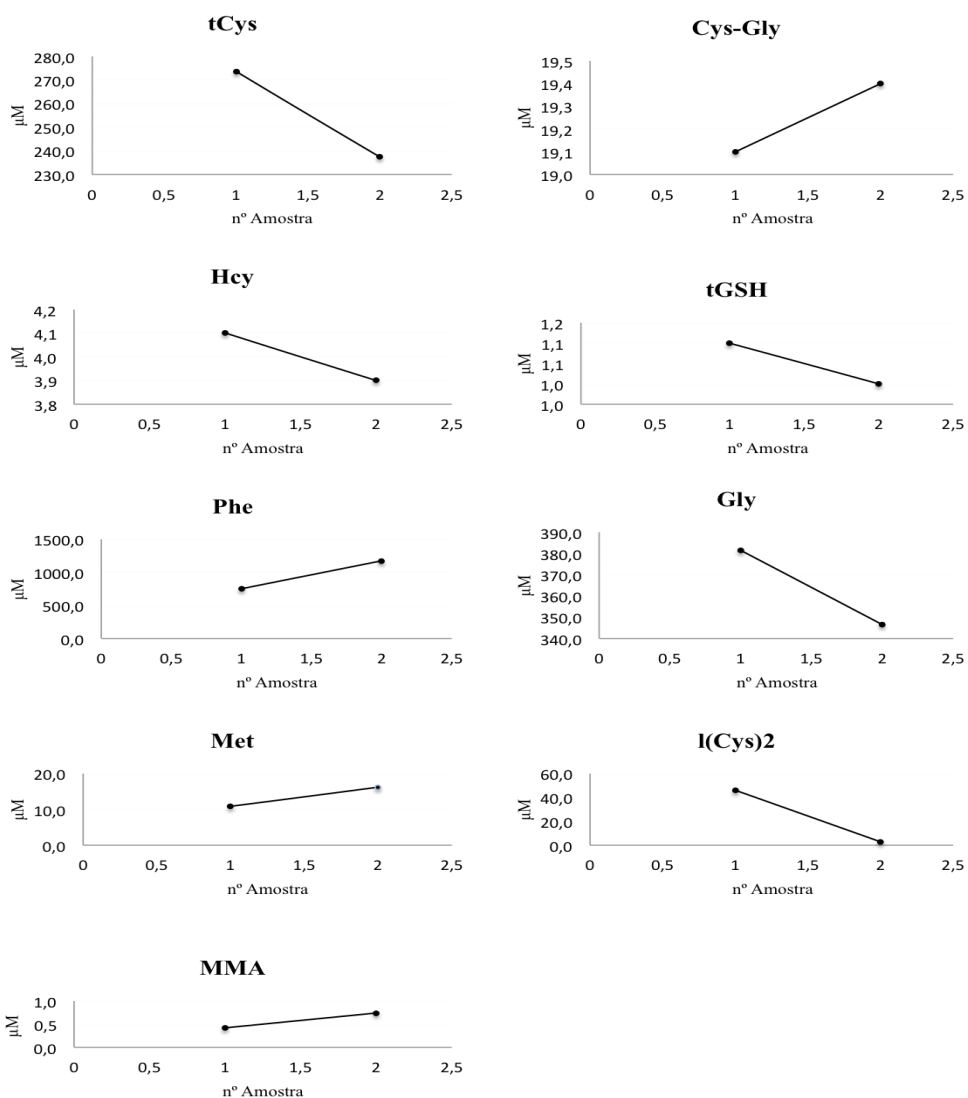
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 12

Metabolitos (µM)										
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1		273,4	19,1	4,1	1,1	752,9	381,5	10,8	46,1	0,4
2		237,4	19,4	3,9	1,0	1175,0	346,5	16,2	2,8	0,7
média		255,4	19,3	4,0	1,1	964,0	364,0	13,5	24,5	0,6
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Mín.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0	

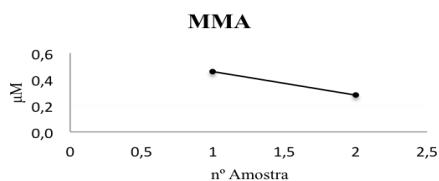
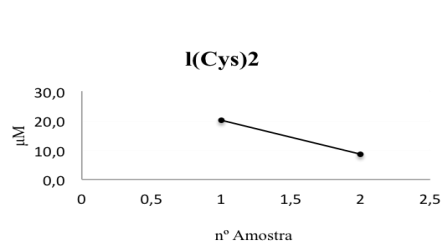
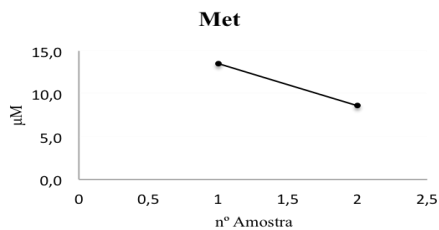
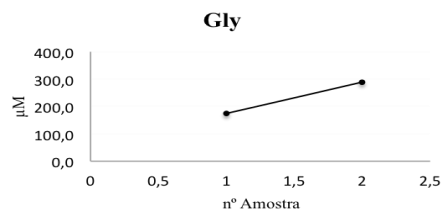
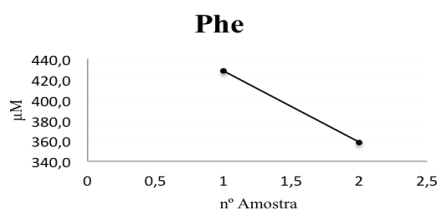
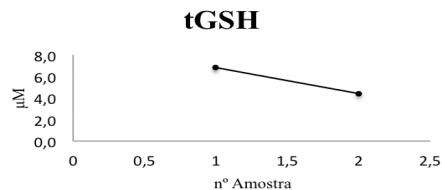
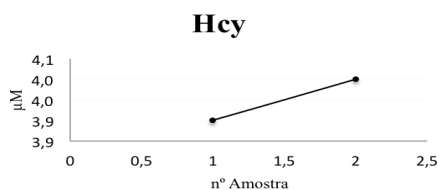
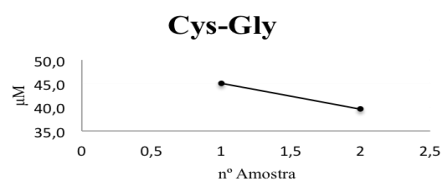
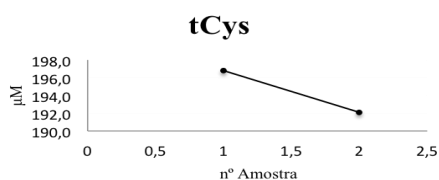
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 13

Metabolitos (μM)									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	196,8	45,1	3,9	6,8	428,1	173,8	13,5	20,1	0,5
2	192,1	39,6	4,0	4,4	358,6	289,1	8,6	8,6	0,3
média	194,5	42,4	4,0	5,6	393,4	231,5	11,1	14,4	0,4
v.r. <sup>a</sup>	Máx.	140,0	32,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Mín.	198,0	34,0	7,0	110,2	514,2	40,9	60,0	

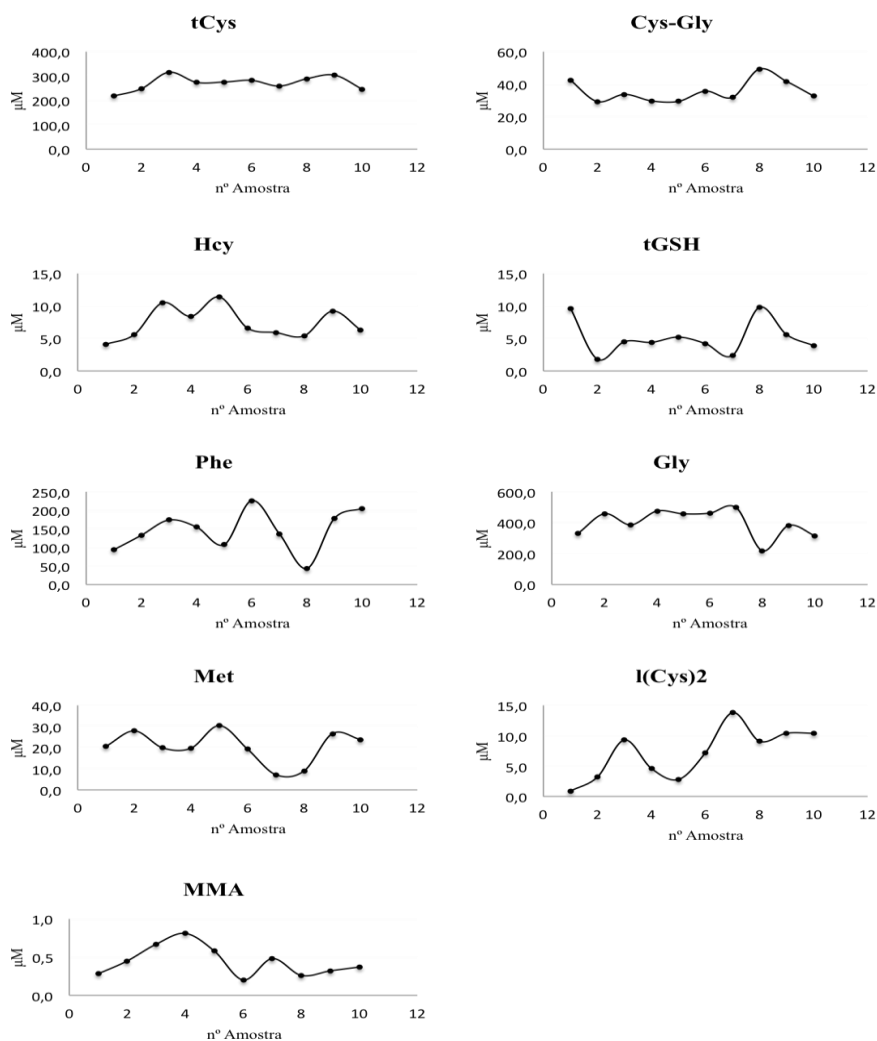
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 14

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	217,4	42,2	4,1	9,6	93,1	328,7	20,5	0,9	0,3
2	247,7	29,3	5,6	1,8	132,7	457,6	27,9	3,2	0,5
3	315,5	33,7	10,5	4,5	173,8	386,2	19,9	9,3	0,7
4	274,3	29,7	8,4	4,4	154,9	475,1	19,7	4,6	0,8
5	275,4	29,4	11,4	5,2	107,4	457,2	30,4	2,8	0,6
6	282,2	35,7	6,6	4,2	226,3	461,6	19,3	7,2	0,2
7	258,8	31,9	5,9	2,4	136,9	497,5	7,2	13,8	0,5
8	289,1	49,3	5,4	9,8	43,2	218,3	9,0	9,1	0,3
9	303,6	41,7	9,2	5,6	178,5	381,8	26,6	10,4	0,3
10	246,1	32,7	6,3	3,9	205,0	315,0	23,8	10,4	0,4
média	271,0	35,6	7,3	5,1	145,2	397,9	20,4	7,2	0,4
v.r. <sup>a</sup> Máx.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	
v.r. <sup>a</sup> Mín.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0	0,4

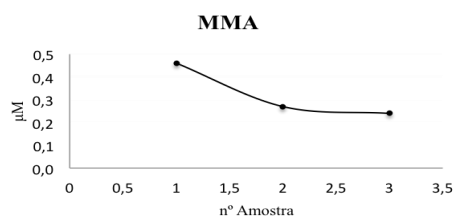
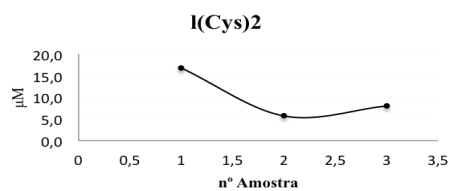
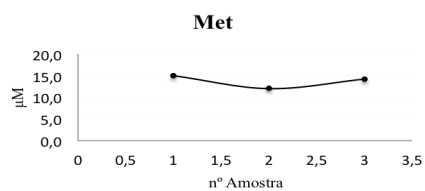
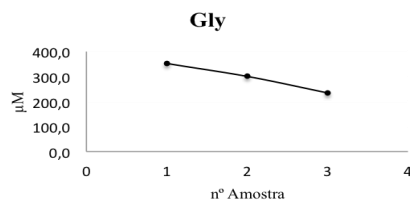
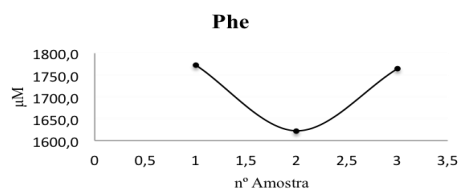
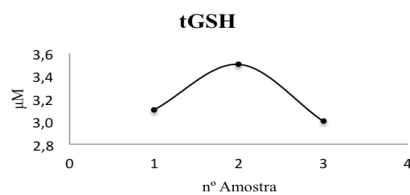
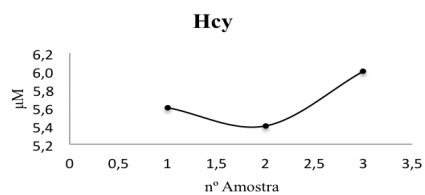
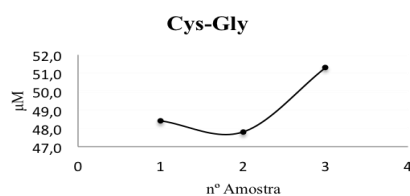
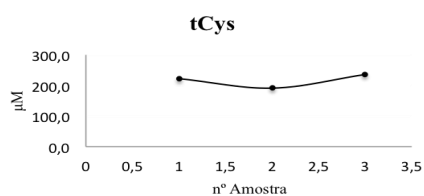
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 15

Metabolitos (µM)									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	223,0	48,4	5,6	3,1	1772,2	351,2	15,0	16,8	0,5
2	191,2	47,8	5,4	3,5	1622,4	300,6	12,0	5,7	0,3
3	235,8	51,3	6,0	3,0	1764,4	234,6	14,2	8,0	0,2
média	216,7	49,2	5,7	3,2	1719,7	295,5	13,7	10,2	0,3
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	7,0	110,2	514,2	40,9	60,0	

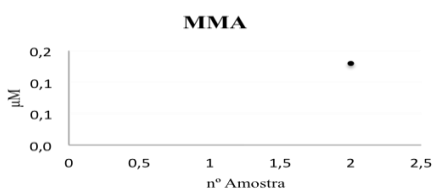
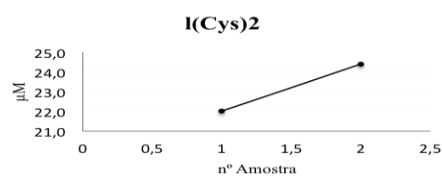
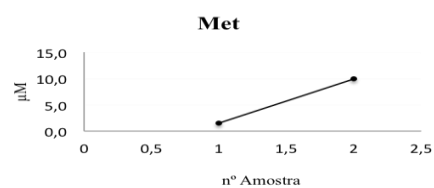
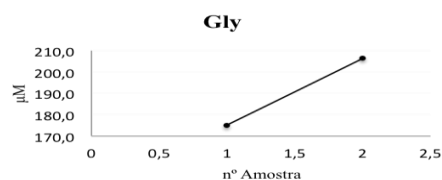
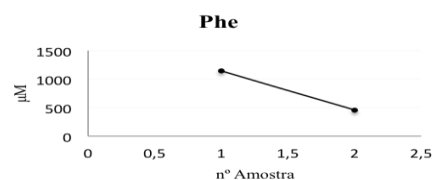
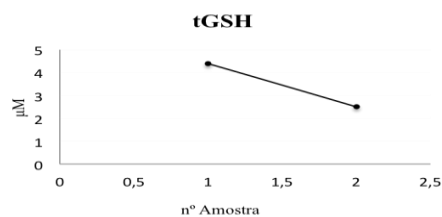
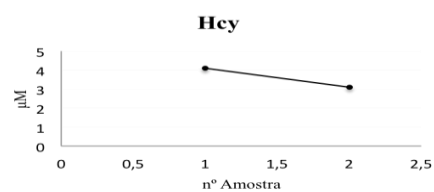
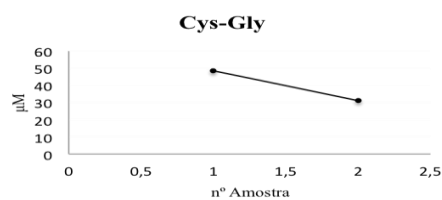
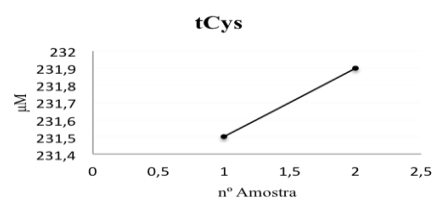
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 16

		Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )							
Amostra		tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2
1		231,5	48,6	4,1	4,4	1138,6	175,1	1,5	22,0
2		231,9	31,1	3,1	2,5	458,9	206,3	9,9	24,4
média		231,7	39,9	3,6	3,5	798,8	190,7	5,7	23,2
v.r. <sup>a</sup>	Min.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

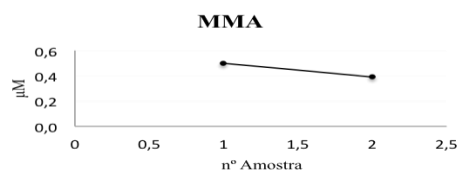
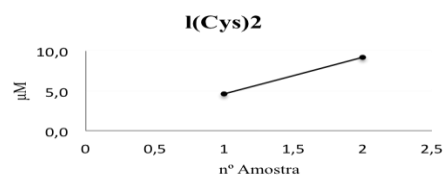
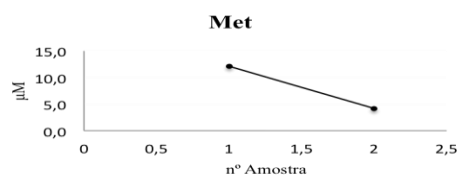
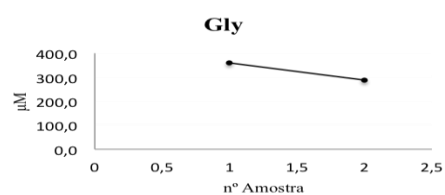
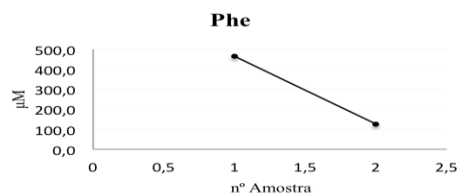
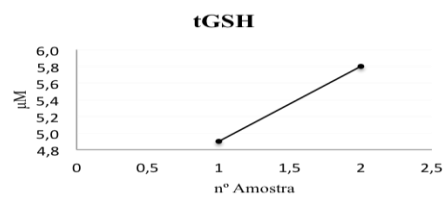
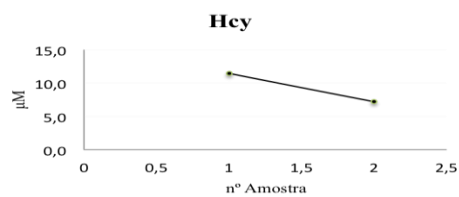
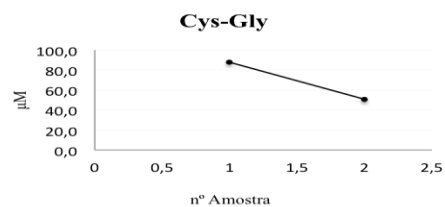
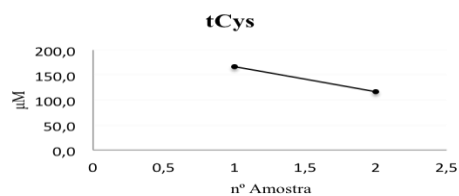
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 17

Metabolitos (μM)									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	167,1	87,7	11,4	4,9	463,8	359,4	12,1	4,6	0,5
2	116,5	50,8	7,2	5,8	126,3	288,2	4,2	9,2	0,4
média	141,8	69,3	9,3	5,4	295,1	323,8	8,2	6,9	0,4
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0

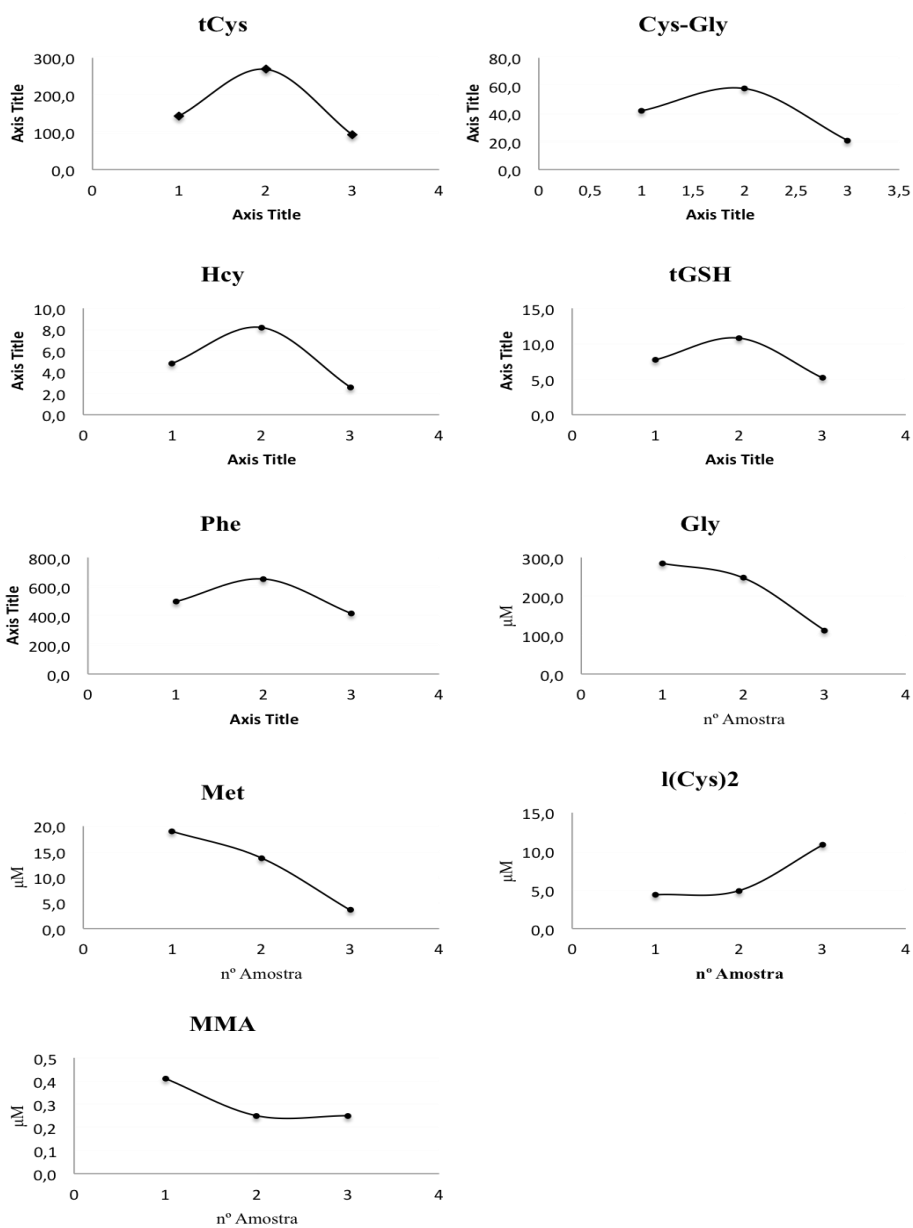
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 18

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	143,1	41,9	4,8	7,7	498,6	285,5	19,0	4,4	0,4
2	269,2	58,0	8,2	10,8	652,3	247,2	13,8	4,9	0,3
3	93,1	20,8	2,6	5,2	415,4	112,4	3,6	10,8	0,3
média	168,5	40,2	5,2	7,9	522,1	215,0	12,1	6,7	0,3
v.r. <sup>a</sup>	Min.	140,0	32,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	8,0	110,2	514,2	40,9	60,0	0,4

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

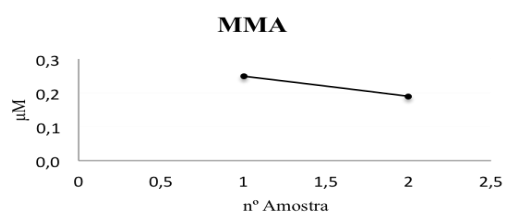
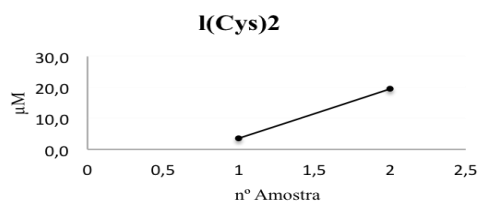
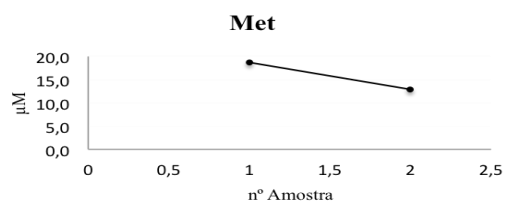
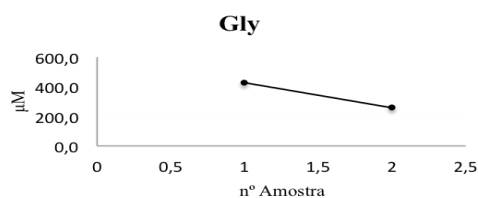
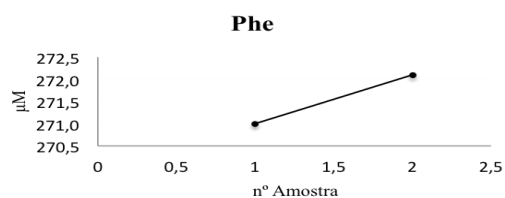
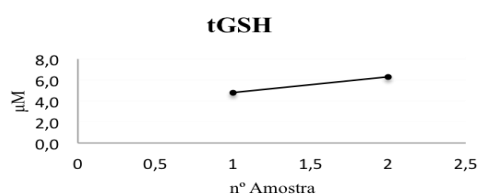
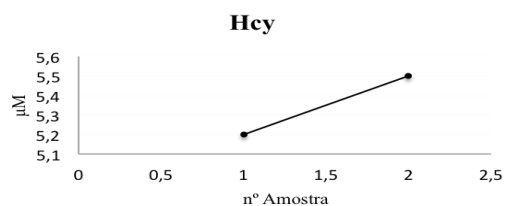
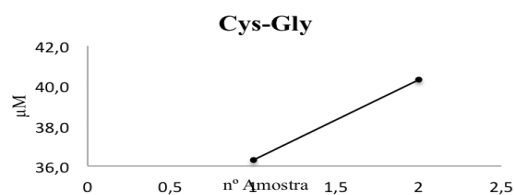
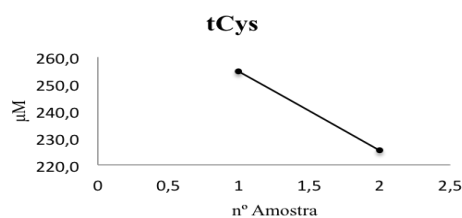




## PKU - Doente 19

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	254,8	36,3	5,2	4,8	271,0	427,3	18,7	3,5	0,3
2	225,3	40,3	5,5	6,3	272,1	257,4	12,9	19,5	0,2
média	240,1	38,3	5,4	5,6	271,6	342,4	15,8	11,5	0,2
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	7,0	110,2	514,2	40,9	60,0	

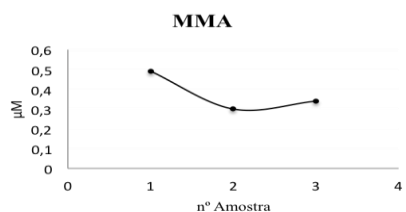
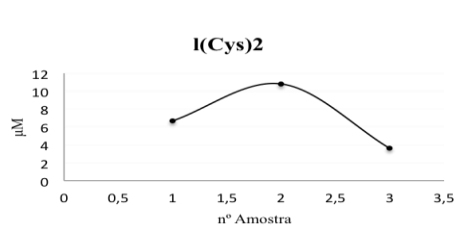
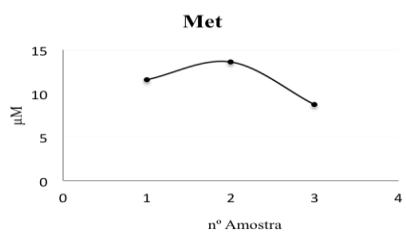
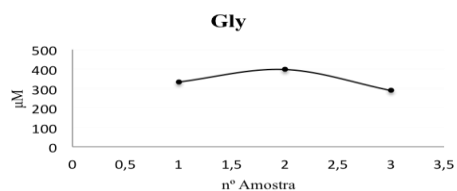
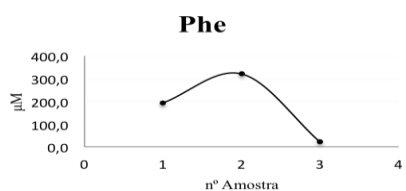
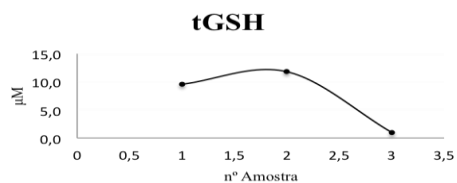
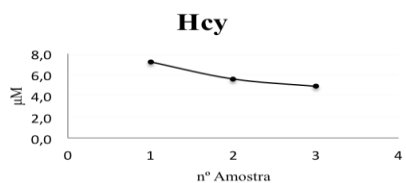
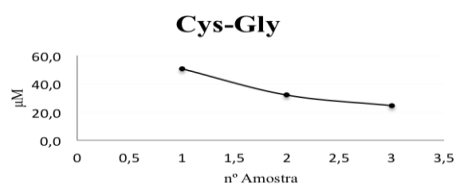
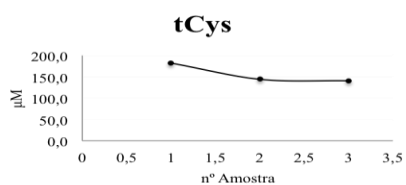
<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 20

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	182,7	50,4	7,2	9,6	192,6	334,3	11,6	6,7	0,5
2	144,2	32,0	5,6	11,8	320,6	397,4	13,6	10,8	0,3
3	140,6	24,5	4,9	1,0	20,9	289,3	8,7	3,6	0,3
média	155,8	35,6	5,9	7,5	178,0	340,3	11,3	7,0	0,4
V.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	4,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	514,2	40,9	60,0	

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência



## PKU – Doente 21

Metabolitos ( $\mu\text{M}$ )									
Amostra	tCys	Cys-Gly	Hcy	tGSH	Phe	Gly	Met	I(Cys)2	MMA
1	141,3	31,2	3,5	2,3	404,1	271,9	13,5	11,0	0,3
2	189,1	40,4	5,3	2,9	380,8	331,2	15,2	3,5	0,3
3	141,5	27,4	3,5	2,5	274,9	316,5	15,2	3,8	0,4
4	135,7	29,1	3,5	2,5	281,4	275,9	16,6	10,6	0,5
5	194	37,1	5,1	4,3	330,4	248,4	17,3	21,1	0,4
6	103,3	21,6	2,7	3,2	388,1	369,2	14,9	22,7	0,4
média	150,8	31,1	3,9	3,0	343,3	302,2	15,5	12,1	0,4
v.r. <sup>a</sup>	Mín.	140,0	32,0	5,0	41,8	227,8	8,7	20,0	0,4
	Máx.	198,0	34,0	7,0	8,0	110,2	40,9	60,0	

<sup>a</sup>v.r. – valor de referência

